

BEST AVAILABLE COPY

Association of active agent with colloidal polymer, preferably new polymeric branched polyol ester, useful for controlled transmucosal administration of e.g. peptide, DNA construct or vaccine

Patent number: DE19839515
Publication date: 2000-03-09
Inventor: KISSEL THOMAS (DE); BREITENBACH ARMIN (DE); JUNG TOBIAS (DE); KAMM WALTER (DE)
Applicant: KISSEL THOMAS (DE); BREITENBACH ARMIN (DE); JUNG TOBIAS (DE); KAMM WALTER (DE)
Classification:
- **International:** A61K9/51; A61K47/48; A61K9/51; A61K47/48; (IPC1-7): A61K9/14
- **European:** A61K9/51; A61K47/48W6B
Application number: DE19981039515 19980829
Priority number(s): DE19981039515 19980829

Report a data error here

Abstract of DE19839515

A pharmaceutical composition contains at least one colloidal polymer-active agent association (A). An independent claim is included for novel polymers (I) which are branched polyol esters consisting of a central molecule (II) to which short-chain, biodegradable hydroxycarboxylic acid ester groups (III) are attached. The reaction parameters (i.e. nature and amount of (II) and catalyst system, nature and length of (III), reaction temperature and reaction time) are selected to optimize (I) for use as the polymer component of (A).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 198 39 515 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
A 61 K 9/14

(21) Aktenzeichen: 198 39 515.9
(22) Anmeldetag: 29. 8. 1998
(23) Offenlegungstag: 9. 3. 2000

EINGANG
PAe Olbricht & Buchhold

10. Mai 2005

Frist:

(71) Anmelder:

Kissel, Thomas, 79219 Staufen, DE; Breitenbach, Armin, 35096 Weimar, DE; Jung, Tobias, 35039 Marburg, DE; Kamm, Walter, 35041 Marburg, DE

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(56) Entgegenhaltungen:

DE	43 10 076 A1
DE	40 38 887 A1
DE	40 13 110 A1
DE	34 30 852 A1
DE	26 11 143 A1
DD	2 93 727 A5
US	51 18 528
EP	7 09 099 A2
WO	95 23 175

Müller R.H.: Colloidal Carriers for Controlle of Drug Delivery and Targeting, Stuttgart 1991: Wiss Verlagsgesellschaft mbH, S.11-13/45,46/160ff;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Neue pharmazeutische Zubereitung, enthaltend kolloidale Polymer-Wirkstoff-Assoziate, insbesondere auch für mucosale Wirkstoffverabreichung

(57) Obwohl eine immer größere Anzahl an pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, wie z. B. Proteinen, Glycoproteinen, Peptiden, Oligonucleotiden sowie DNA-Konstrukten und Wachstumsfaktoren, zugänglich wird, ist deren Anwendung ohne geeignete Trägersysteme durch Nebenwirkungen erschwert bzw. teilweise nicht möglich. Der Einsatz von gezielt für diese Aufgabenstellung hergestellten neuen bioabbaubaren Polyoleestern eröffnet zwei neue Wege, diese Wirkstoffe therapeutisch einzusetzen.

a) Gezielt als wasserlöslich hergestellte neuartige Polyolester interagieren spontan mit den relevanten Wirkstoffen und bilden kolloidale Komplexe.

b) Neuartige Polyolester, gezielt lipophiler hergestellt, werden durch kontrollierte Fällung in Nanopartikel überführt und dabei oder nachträglich mit den Wirkstoffen beladen.

In beiden Fällen erhält man wirkstoffhaltige Kolloide, die die Bioverfügbarkeit, Bioverteilung und Wirksamkeit der Wirkstoffe gezielt verbessern und human- oder veterinär-medizinische Anwendungen über mucosale Applikationswege ermöglichen. Andererseits ergibt sich nach parenteraler Applikation die Möglichkeit, genannte Wirkstoffe gezielt über/an biologische Barrieren zu therapeutisch relevanten Körperarealen zu transportieren.

DE 198 39 515 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neuartige pharmazeutische Formulierungen, in kolloidalen Form, bestehend aus wenigstens einem biokompatiblen und bioabbaubaren Polymer in Kombination mit wenigstens einem Wirkstoff, deren wirkort-, wirkart- und wirkstoffadaptierter Herstellung, und deren Verwendung, insbesondere auch für die mucosale Wirkstoffverarbeitung.

[Stand der Technik]

In der modernen Pharmakotherapie werden Wirkstoffformulierungen und Wirkstoffkombinationen immer wichtiger, die den(die) Wirkstoff(e) in eine applizierbare Form bringen und dabei besonders die Wirkstoffstabilität, dessen Bioverteilung, Bioverfügbarkeit und/oder Resorption positiv beeinflussen. Durch große Fortschritte in der Molekularbiologie, Gen- und Biotechnologie wird zunehmend eine immer größere Anzahl an pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, wie z. B. Proteinen, Glycoproteinen, Peptiden, Oligonucleotiden sowie DNA Konstrukten und Wachstumsfaktoren, zugänglich. Allerdings ist die human- oder auch veterinärmedizinische Anwendung dieser Substanzen ohne geeignete Trägersysteme durch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen erschwert bzw. sogar zum Teil nicht möglich.

Insbesondere für Impfstoffe, wie z. B. Tetanus- und Diphtherie-Toxoid, sowie virale Antigene, fehlen derzeit geeignete Trägersysteme, die eine einfache, billige, für den Patienten angenehmere und besonders im Hinblick auf die Erreichbarkeit von Patienten, z. B. in der 3. Welt, zuverlässige Immunisierung ermöglichen.

Literaturbeschriebene Versuche zeigen, daß mittels parenteralen biopolymeren Depot- bzw. Retardierungsformulierungen in Implantat- oder Mikropartikelform zwar eine prinzipielle Verbesserung erreichbar ist, dennoch bleiben bisher deutliche Erfolge für diese Systeme aus, was nicht zuletzt auch auf den Mangel an geeigneten biopolymeren Trägern zurückzuführen ist.

Daher wurde vielerorts auch einen anderer, gezielteren Weg für die Verabreichung von pharmakologisch relevanten Wirkstoffen beschritten. Es ist bereits literaturbekannt, daß partikuläre Systeme bei Applikation auf Schleimhäuten von spezifischen Strukturen des mukosalen Immunsystems (MALT: mucosa associated lymphoid tissues) im günstigsten Falle resorbiert werden können. Hierbei kamen allerdings bisher nur Systeme zum Einsatz, bei denen die beobachteten Transportphänomene auf eine weitestgehend unspezifische Resorption hindeuten. Dabei deutet sich allerdings an, daß eine Partikelgrößenabhängigkeit vorliegen könnte.

Erste literaturbeschriebene Versuche, auf diesem Wege auch pharmakologisch aktive, niedermolekulare Substanzen, die mit solchen kolloidalen Systemen assoziiert sind, in den Körper zu transportieren, zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse.

Hingegen sind makromolekulare, meist hydrophile Wirkstoffe bislang diesen Invasionsverfahren nicht zugänglich, was insbesondere auf den Mangel geeigneter Trägerpolymere sowie auf die bisher bekannten, zu "aggressiven" Partikelherstellungstechnologien zurückzuführen ist.

Probleme bei der Assoziation der meist hydrophilen, makromolekularen, pharmakologisch aktiven Wirkstoffe mit polymeren oder partikulären Systemen liegen also zum einen in ihrer oft zu geringen Stabilität gegenüber den üblichen Herstellungsweisen, z. B. zu aggressive Polymerisationsverfahren oder Dispergierverfahren, wie Hochdruckhomogenisation oder Ultraschalldispersierung, bzw. den bei diesen Verfahren herrschenden Bedingungen (Temperaturerhöhung, Kontakt mit lipophilen Lösungsmitteln, etc.).

Weitere Probleme liegen aber auch insbesondere bei bisher nicht ausreichenden Kompatibilität und Interaktion zwischen Träger(-polymer) und Wirkstoff. Biokompatible Polymere wurden zwar bereits für die Verwendung in Retardierungsformulierungen (Depotsysteme) vorgeschlagen, Ansprüche bzw. Ausführungsbeispiele im Sinne der vorliegenden Erfindung fehlen aber bisher. Besonders die bewußte Adaption aller Komponenten, also insbesondere Trägerpolymer(e), Wirkstoff(e), Applikationsart(en) und -ort(e), etc., an die besonderen Bedürfnisse derartiger Anwendungen wurde bisher nicht gezielt angestrebt.

[Aufgabe der Erfindung]

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, pharmazeutische Formulierungen vorzusehen, die aus wenigstens einem biokompatiblen und bioabbaubaren Polymer (Komponente 1) und wenigstens einem Wirkstoff (Komponente 2) bestehen und als kolloidales Systemen (d. h. also partikulär im Mikron- und Submikron-Größenbereich) vorliegen, die sich gegenüber bekannten Trägersystemen auszeichneten durch

55. 1. die Fähigkeit, die meist makromolekularen, hydrophilen Wirkstoffe in biologisch aktiver Form unbeschadet zu assoziieren.
2. die Fähigkeit, die unter 1. genannten Assoziate, wenn erforderlich, steuerbar zum therapeutisch sinnvollen Zielort zu führen.
3. die Fähigkeit gemäß 1. und 2., daß dieser Zielort der mucosale Zielort ist.
4. eine geringere Zahl notwendiger Verfahrensschritte während der Herstellung.
5. Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit des Trägerpolymers.
6. eine geringere toxische Wirkung auf das umgebende Gewebe.
7. eine ausreichend lange Verweilzeit, gemäß 3. auf mukosalen Oberflächen.
8. eine Wirkstoffanreicherung, gemäß 3. auf mukosalen Oberflächen.
9. eine eventuell erforderliche ausreichende zelluläre Aufnahme.
10. gemäß 3., die Fähigkeit zur Induktion einer Immunantwort, wenn der relevante Wirkstoff ein Antigen zur Immunisierung ist.
11. gemäß 10., die Fähigkeit zur Induktion einer Immunantwort, wenn der relevante Wirkstoff ein DNA Konstrukt

DE 198 39 515 A 1

ist.

Daher ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, schonende Verfahren zur Herstellung derartiger pharmazeutischer Zubereitungen vorzusehen, die den Anforderungen von einem oder mehreren der Teilaufgaben 1. bis 11. entsprechen, und für deren Herstellung wenigstens ein Trägerpolymer (Komponente 1) sowie wenigstens ein relevanter biologisch aktiver Wirkstoff (Komponente 2), der allein oder in physikalisch oder chemischer Form assoziiert vorliegen kann, zum kolloidalen Trägersystem vereint werden sollen.

Dazu ist es als weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung nötig, geeignete Trägerpolymere zur Verfügung zu stellen, die den oben genannten Aufgaben/Aspekten entsprechen.

[Lösung der Erfindung]

Das Auffinden geeigneter Trägerpolymere wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch verzweigte Polyolester gelöst, welche aus einem Zentralmolekül (ladungsmodifizierte und ungeladene Polyole), an das kurzkettige, bioabbaubare Hydroxycarbonsäureestergruppierungen angehängt sind, bestehen.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die Einstellbarkeit des amphiphilen Charakters, also der Balance von hydrophoben, hydrophilen und gegebenenfalls geladenen Bestandteilen, der somit ebenfalls erfundungsgemäß Trägerpolymere in unerwarteter Weise dazu geeignet ist, diese mit suffizienten Mengen an relevanten Wirkstoffen zu assoziieren, sowie diese Assoziate dann in kolloidaler Form z. B. zu, auf und durch Zellbarrieren zu tragen.

Zu den Eigenschaften der Polymere, die sich überraschend als definiert einstellbar herausstellten, zählen neben dem amphiphilen Charakter unter anderem auch deren Löslichkeit. Sie ließ sich für das breite Spektrum von Wasserlöslichkeit bis hin zur Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln einstellen, wobei der erfundungsgemäß bevorzugte Bereich toxikologisch unbedenkliche Lösungsmitteln beeinhaltet: von Wasser über Alkohole (wie z. B. Ethanol) und Ester (wie z. B. Ethylacetat) bis hin zu Ketonen (wie z. B. Aceton), sowie auch deren Kombinationen.

Die Löslichkeit in Wasser ließ sich darüberhinaus überraschenderweise nicht nur im Bereich von gut bis schlecht löslich einstellen, sondern es wurde eine, in Abhängigkeit der Polymergesamtzusammensetzung einstellbare Untere Kritische Entmischungstemperatur (LCST) aufgefunden.

Erfundungsgemäße Trägersysteme bestehen aus wenigstens einem bioabbaubaren und biokompatiblen Polyolester und wenigstens einem relevanten Wirkstoff (also Komponente 1 und 2). Die Eigenschaften der Trägerpolymere (Komponente 1) können dabei sowohl bezüglich ihres Transportsportverhaltens *in vivo* als auch bezüglich ihrer Kompatibilität zu bzw. ihrer Interaktion mit Wirkstoffen synthetisch optimiert werden. Weiterhin lassen diese Eigenschaften auch die Auswahl der zu verwendenden schonenden Herstellungstechnologie des erfundungsgemäßen Trägersystems (gemäß der zweitgenannten Aufgabenstellung) zu.

(I) Im Falle von definiert eingestellter Löslichkeit der Polymere in Wasser, besteht die Herstellungstechnologie für die pharmazeutischen Formulierungen nach Teilaufgabe 2 darin, daß die Herstellung des erfundungsgemäßen Trägersystems durch überraschend gefundene spontane *in-situ* Ausbildung von somit ebenfalls erfundungsgemäßen kolloidalen Polymer-Wirkstoff-Komplexen erfolgt, wenn eine Lösung A mit Komponente B vereinigt wird. Dabei muß Lösung A ein erfundungsgemäßes Polymer enthalten und Komponente B ist wenigstens ein relevanter Wirkstoff oder enthält diese(n) in chemisch gebundener oder physikalisch assoziierter Form. Komponente B kann dabei a) selbst Bestandteil von Lösung A oder b) eine zweite Lösung sein.

(II) Ist, z. B. aus Kompatibilitätsgründen zum Wirkstoff, eine höhere Lipophilie der Polymere erwünscht, wird die Löslichkeit der Polymere definiert auf Löslichkeit in untoxischen organischen Lösungsmitteln bzw. auch Lösungsmittelgemischen, wie z. B. Estern, Ethern, Alkoholen, Ketonen eingestellt und dann erfundungsgemäß als Herstellungstechnologie eine modifizierte Solvent Deposition Methodik bevorzugt, bei dem erfundungsgemäße Trägersysteme zeitgleich (*in-situ*) oder in einem nachgeschalteten Schritt ädsorptiv oder chemisch mit wenigstens einem relevanten Wirkstoff assoziiert werden.

Komponente 1

Polymere und deren Herstellung

Die somit als eine Komponente des erfundungsgemäßen Trägersystems dienenden verzweigten Polyolester, bestehend aus einem Zentralmolekül (modifizierte und unmodifizierte Polyole), das durch das gezielte synthetische Anhängen kurzkettiger bioabbaubarer Hydroxycarbonsäureestergruppierungen eigenschaftsmodifiziert und eigenschaftsoptimiert ist, werden bevorzugt durch sog. Melt Grafting hergestellt.

Erfundungsgemäß bevorzugtes Melt Grafting bezeichnet dabei die Reaktion von einer oder mehreren Hydroxycarbonsäure/n in dimerer oder Laktonform (im folgenden auch als Monomere bezeichnet) oberhalb eines ihrer Schmelzpunkte in Gegenwart des/der Zentralmoleküle unter Verwendung eines zur ringöffnenden Polymerisation geeigneten Katalysators.

Katalysatoren können alle zur Ringöffnenden Polymerisation geeigneten Substanzen sein, bevorzugt werden aber untoxische und durch z. B. die FDA zugelassene Katalysatoren, wie Zinn und dessen Salze, Zink und dessen Salze sowie Hydride wie z. B. Calciumhydrid.

Besonderheit dieser Reaktion zur gezielten Einstellung der Eigenschaften der erfundungsgemäßen Trägerpolymere ist dabei zum einen, daß sich die Zentralpolyole in definiertem, ausreichenden Maße bei erfundungsgemäß bevorzugtem Melt Grafting in der Schmelze der Monomere lösen müssen. Dann können durch geeignete Auswahl der Synthesebedingungen (Mengenverhältnisse, Reaktionstemperatur und Reaktionszeit, Wahl des Zentralpolyols, etc.) die erforderlichen

DE 198 39 515 A 1

Eigenschaften des Zentralpolyols gezielt manipuliert und auf die Anforderungen des Trägersystems zugeschnitten werden.

Zentralpolyole sind daher bevorzugt:

- 5 a) lineare synthetische Polymere mit >6 bis 500 Hydroxylgruppen, insbesondere Polyvinylalkohole (PVA) mit Polymerisationsgraden von >6 bis 500 (und Verseifungsgraden von 70 bis 98%, sofern durch Hydrolyse von Poly(vinylacetat) erhalten);
- b) lineare synthetische Vinylcopolymer, insbesondere des Polyvinylalkohols, mit >6 bis 500 Hydroxylgruppen, insbesondere mit Vinylacetat, Vinylpyrrolidon, Vinylaminen, Vinylimidazolen, Vinylpyridinen, Vinylsulfonsäuren, Vinylphosphorsäuren.
- 10 c) lineare, verzweigte oder cyclische, geladene oder ungeladene Polysaccharide, insbesondere Stärken oder Bestandteile, Glycogene, Cellulosen oder Bestandteile, Dextrans, Tunicine, Inuline, Chitine, Alginat, Mannane, Galactane, Xylane und andere Polyosen, Chondroitinsulfate, Heparin, Hyaluronsäure und andere Glykosaminoglykane, Mureine, Dextrine, Cyclodextrine, Chitosane, sowie insbesondere deren teilhydrophobisierte Derivate, wobei Hydrophobisierung durch Methyl- und/oder Ethyl-Ether, -Ester und/oder -Urethan-Verknüpfung erreicht ist.
- 15 d) insbesondere oben aufgeführte Polyoole, mit der Besonderheit, daß sie zusätzlich eine oder mehrere Carboxyl-, Sulfobutyl- oder Sulfopropyl-Gruppe(n) und/oder Butylamin-, Propylamin- oder Ethylamin- (primäres, sekundäres, tertiäres oder quartäres Amin, wobei entsprechende N-Substituenten insbesondere -H, -CH₃ und/oder -C₂H₅-Gruppe(n) darstellen) -Gruppe(n) enthalten, die in Form von Ether-, -Ester- oder -Urethan-Verknüpfung an das Polyoal gebunden sind.

Im Falle von Polyolen, die geladene und/oder protonierbare und/oder deprotonierbare Gruppen tragen, auch deren Alkalimetall- bzw. Halogen-Salze, insbesondere deren Natrium- bzw. Chloridsalze.

Da zu den erfindungsgemäß bevorzugten Zentralpolyolen ebenfalls Polysaccharide gehören, muß bei deren Verwendung eine ausreichende Löslichkeit und Stabilität in der Schmelze der Monomere gewährleistet sein. Bei nichtladungsmodifizierten Polysacchariden wird dies z. B. durch literaturbekannte gezielte Teilacylierung erreicht.

Bei ladungsmodifizierten Polysacchariden wird die zusätzlich eingeführte Hydrophille, bedingt durch die ladungstragenden und/oder (de)protonierbaren Gruppe(n), durch geeignete aliphatische lipophile Spacerkettenlänge überkompenziert. Dies wird z. B. wie bereits oben ausgeführt durch Sulfobutyl- oder Sulfopropyl-Ether-, -Ester- oder -Urethan-Gruppen und/oder Butylamin- oder Propylamin- (primäres, sekundäres, tertiäres und/oder quartäres Amin, wobei entsprechende N-Substituenten bevorzugt -H, -CH₃ und/oder -C₂H₅-Gruppe darstellen) -Ether, -Ester oder -Urethan-Gruppen erreicht.

Nur wenn diese Löslichkeit der Zentralpolyole gewährleistet ist, können z. B. über Syntheseeinwaagemengen, Wahl und Menge des Katalysator(-systems)s, Reaktionstemperatur(en) und -Zeit(en) die erfindungsgemäß erforderlichen Eigenschaften der Trägerpolymere (Komponente 1) adäquat eingestellt werden, z. B. über die Länge der Hydroxycarbonäuregruppierungen. Ein Kriterium, daß dann z. B. mit bekannten spektroskopischen Analysemethoden – wie der NMR Spektroskopie – leicht überprüft werden kann.

Besonderheit dieser Reaktion zur gezielten Einstellung der Eigenschaften der erfindungsgemäßen Trägerpolymere ist weiterhin, daß erst die Kombination aus geeignetem Zentralpolyol bzw. dessen Eigenschaften und der Wahl des/der Monomer(e), sowie der Reaktionsbedingungen im Hinblick auf spätere(n) Wirkstoff(e), dessen/deren Assoziation mit dem polymeren Träger sowie dessen/deren schoneneden Herstellung und dessen/deren in-vivo Transportverhalten zu einem erfolgversprechenden Trägersystem führt.

Die zur Eigenschaftsadaption der Zentralpolyole bevorzugten Hydroxycarbonsäureestergruppierungen werden bevorzugt durch Reaktionsprodukte von Dimeren/Anhydriden/Lactonen von Hydroxycarbonsäuren (Monomere) hergestellt. Hierbei kommen alle die in Frage, deren Polymerisationsprodukte als biologisch unbedenklich gelten. Erfindungsgemäß bevorzugt werden L-Lactid, D,L-Lactid und Glycolid, da diese in-vivo leicht zu Milch- und Glycolsäure metabolisiert werden können.

Hierbei hat sich beispielhaft überraschend herausgestellt, daß insbesondere Verhältnisse Polyol-OH-Gruppe zu Säurebaueinheit im Bereich von 0,6 : 1 bis 6 : 1, insbesondere im Bereich von 1 : 1 bis 3 : 1 zur Bildung von wasserlöslichen Trägerpolymeren führt, die in den Beispielen ausgeführten Fällen zudem noch eine Untere Kritische Entmischungstemperatur im Wäßrigen besitzen.

Des Weiteren hat sich herausgestellt, daß – wenn die Hydroxycarbonsäuregruppierungen am Zentralpolyol jeweils aus 1 bis 100, und insbesondere 5 bis 50 Bausteinen zusammengesetzt sind – eine Löslichkeit in z. B. Aceton resultiert.

In der Literatur werden zwar Polylester auf der Basis eines Polyols mit Poly(hydroxycarbonsäuren)seitenketten für biomedizinische Anwendungen vorgeschlagen. Gezielte Studien zur synthetischen Einstellung der Polymereigenschaften und im besonderen der Einstellung der Polymereigenschaften auf die besonderen Bedürfnisse der erfindungsgemäßen Ansprüche fehlen aber völlig.

Beispielhaft diesen Literaturbefund erläuternd seien daher an dieser Stelle genannt: EP 0 407 617 beschreibt zwar Reaktionsprodukte aus Poly(hydroxycarbonsäureestern) und Sacchariden, ebenso beschreiben DE 34 30 852 A1 und DE 40 21 517 A1 Polymere aus Poly(hydroxycarbonsäureestern) und Polyolen, Ansprüche bzw. Ausführungsbeispiele im Sinne der erfindungsgemäßen kolloidalen Trägersysteme fehlen aber völlig. WO 95/23175 beschreibt Poly(hydroxycarbonsäureester)-Polyole und deren Verwendung als Depotmatrixsystem für die Retardierung von pharmakologisch aktiven Substanzen. Ansprüche bzw. Anwendungsbeispiele im Sinne des erfindungsgemäßen kolloidalen Trägersystems, insbesondere zur mucosalen Wirkstoffverabreichung fehlen. Des Weiteren ist die gezielte Steuerung der Polymereigenschaften nicht beschrieben, sowie überhaupt die prinzipielle Möglichkeit bei dort angeführten Beispielen anzuzweifeln. USP 4745160 beschreibt bioabbaubare amphiphatische Copolymer, USP 5210108 abbaubare Schaummaterialien, erfindungsgemäß Ausführungsbeispiele bzw. Ansprüche fehlen völlig. USP 5612412 sowie USP 5712334 beschreiben die Synthese von lactonmodifizierten Polyvinylalkololen (PVA), der vorliegenden Erfindung entsprechende Ansprüche

DE 198 39 515 A 1

bzw. Ausführungsbeispiele fehlen aber vollständig. USP 5331045 beschreibt die Synthese von poly(hydroxycarbon-säureester)modifizierten Polyvinylalkoholen (PVA) durch Polykondensation von PVA mit monomeren Hydroxycarbon-säuren. Ein Verfahren, das nach derzeitigem Stand der Technik Verunreinigungen in Form von Poly(hydroxycarbon-säureester)-Homopolymeren nicht ausschließt, was eine derartige Herstellung für die erfundungsgemäßen kolloidalen Trägersysteme als nicht wünschenswert erscheinen läßt.

5

Komponente 2

Wirkstoffe

Überraschend wurde gefunden, daß alle relevanten und insbesondere hydrophile Wirkstoffe erfundungsgemäß herangezogen werden können. Erfundungsgemäß bevorzugt werden daher alle Wirkstoffe, die ausgewählt werden aus der Gruppe: aktive Peptide, Proteine, Enzyme, Enziminhibitoren, Antigene, Cytostatika, Antiinflammatorika, Antibiotika, DNA Konstrukte und Wachstumsfaktoren.

10

Erfundungsgemäße Trägersysteme dienen aber insbesondere auch – allerdings ohne darauf eingeschränkt zu sein – gem. Teilaspekten 3. bzw. 8. bis 11. der ersten Aufgabenstellung als kolloidale Träger für mukosale bzw. transmukosale Verabreichung von relevanten hydrophilen Wirkstoffen, wie z. B. Proteinen, Peptiden, Oligonucleotiden und DNA Konstrukten sowie auch lipophilen Wirkstoffen, wie z. B. Corticosteroiden und steroiden Sexualhormonen.

15

Erfundungsgemäße pharmazeutische Formulierungen zur mukosalen Applikation können dabei in unterschiedlicher Weise verabreicht werden, z. B. sublingual, buccal, oral, nasal, pulmonal, vaginal, okular oder gastrointestinal.

20

Derartige Formulierungen sind für alle pharmazeutisch relevanten, biologisch aktiven Stoffe von Interesse, wenn ein Wirkstofftransport an, in oder durch die Mukosa erwünscht ist. Besonders vorteilhaft sind sie für Wirkstoffe, die ohne den Einsatz eines erfundungsgemäßen kolloidalen Trägersystems bei sublingualer, buccaler, oraler, nasaler, pulmonaler, vaginaler, okularer oder gastrointestinaler Verabreichung zerstört oder inaktiviert werden, bzw. für die eine hohe lokale mukosale Konzentration erwünscht ist.

25

Erfundungsgemäß für mukosale Verabreichung bevorzugte Wirkstoffe (WS) sind demnach:

1) Gruppe der hydrophilen makromolekularen pharmakologisch relevanten WS:

1.1 Impfstoffe, die ausgewählt werden der Gruppe: Lebend-Impfstoffe, Tot-Impfstoffe, Toxoid-Impfstoffe, DNA Konstrukte sowie deren adjuvierte Zubereitung und gerichtet sind gegen pathogene Keime bzw. deren pathogenen Metaboliten, von denen literaturmäßig der mukosale Penetrationsweg bekannt ist bzw. die vorwiegend auf mukosalen Oberflächen kolonisieren, wie z. B. Helicobacter pylori, typhiforme Salmonellen, Vibrio cholerae, Neisserien (N. gonorrhoeae, N. meningitidis), Entamoeba histolytica, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Hepatitis A-Viren, colon- bzw. vagina-kolonisierende Staphylokokken, Streptokokken Typ A & B, Klebstellen (K. pneumoniae, K. oxytoca, K. rhinoscleromatis); Shigellen, Yersinien, Vibrionen, Pseudomonas aeruginosa, Legionellen, Korynebakterium diphtheriae, Bacillus anthracis, Mycobakterien (M. tuberkulosis, M. leprae), Treponema palli-dum, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydien (C. trachomatis, C. pneumoniae), Polio-Viren, Rhino-Viren, Myxoviren (Masern-V., Mumps-V., Parainfluenza-V.), Röteln-Virus, Rotaviren, Adeno-Viren, Influenzaviren, Herpes-Viren (Varizellen-Zoster-Virus, Zytomegalievirus, Herpes Simplex Virus, EB-V), HAV, HEV

30

1.2 Impfstoffe, die ausgewählt werden der Gruppe: Lebend-Impfstoffe, Tot-Impfstoffe, Toxoid-Impfstoffe, DNA Konstrukte sowie deren adjuvierte Zubereitung und gerichtet sind gegen pathogene Keime bzw. deren pathogenen Metaboliten, bei denen bekanntermaßen ein parenteraler Infektionsweg vorliegt, aber eine mukosale Applikation systemische, spezifische Immunglobulintiter hervorruft, wie z. B. Clostridium tetani, Clostridium botulinum, Yersinia pestis, Borrelia burgdorferi, Tollwut-Virus, HIV-1 & HIV-2, HBV, HCV, HDV

35

2) Gruppe der lipophilen pharmakologisch relevanten Wirkstoffe, wie z. B. Corticosteroide, steroidale Sexualhormone, Cyclosporin A, Nystatin, Amphotericin B, Clotrimazol, Econazol, Miconazol, Fluconazol, Itraconazol, Bifonazol, sowie Antibiotika

40

45

Herstellung der kolloidalen Assoziate

50

[I] Polymer-Wirkstoff-Komplexe

55

(Lösung Aufgabe 2 – Methode 1)

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Formulierungen, die in Form von Polymer-Wirkstoff-Komplexen in kolloidaler Form aus mindestens einem Polymer und mindestens einem Wirkstoff bestehen. Der Wirkstoff kann dabei selbst ein Partner in dem Komplex sein oder an einem Partner des Komplexes gebunden sein. Dabei wurde überraschend gefunden, daß erfundungsgemäß Polymere mit relevanten Wirkstoffen spontan selbstassemblierende Assoziate, hier auch Komplexe genannt, ausbilden und daß deren Eigenschaften über einfache Parametervariationen manipuliert und optimiert werden konnten.

60

Es ist bereits literaturbekannt, daß geladene Makromoleküle mit Ionen entgegengesetzter Ladung ionische Verbindungen bilden, die oft, abhängig von der Ladungsverteilung, dem Molekulargewicht und der Hydrophobizität des Endprodukts, aus wäßrigen Lösungen ausfallen. Dabei werden niedermolekulare Ionen gleicher Ladung durch die höhermolekulare Verbindung verdrängt, Phänomene, die unter dem Oberbegriff "Polyelektrolyteffekt" zusammengefaßt werden. Stand der Technik sind unter anderem die Ausbildung von Gelen (Zusammensetzen von Alginatlösungen und Ca^{2+}) oder auch Proteinfällungen. Derartige Polyelektrolytkomplexe können prinzipiell entweder aus einer makromolekularen,

65

mehrfach geladenen Komponente einer Polarität und vielen niedermolekularen Ionen der anderen Polarität, oder aber aus zwei makromolekularen, jeweils mehrfach geladenen Partnern verschiedener Polarität bestehen. Hohlkapseln, die aus solchen Polyelektrolytkomplexen hergestellt werden, sind beispielsweise beschrieben in BE-A 9 01 704, EP-A 01 27 989, A 01 27 989, EP-A 01 88 309, EP-A 01 27 713, DE-A 32 09 127, EP-A 01 52 898, US 44 87 758, DE-A 32 09 098, 5 US 44 09 331. Es ist ebenfalls literaturbekannt, z. B. in DE 00 040 13 110 A1 beschrieben, daß Polyelektrolytkomplexe in mikropartikulärer Form hergestellt werden können und dabei eine Verbesserung der therapeutischen Einsetzbarkeit und Breite eines Wirkstoffes ermöglichen.

Überraschend wurde nun aber gefunden, daß auch die erfundungsgemäßen bioabbaubaren, somit toxikologisch völlig unbedenklichen Polymere, selbst ohne eindeutige Polyelektrolyteigenschaften Komplexe mit pharmakologisch relevanten Wirkstoffen spontan, aufgrund hydrophiler-hydrophober Wechselwirkung, ausbilden. Desweiteren überraschend ist die einfache Steuerbarkeit dieser Wechselwirkung durch gezielte Trägerpolymermanipulation von hydrophiler-hydrophober Wechselwirkung bis hin zu interiorischer Wechselwirkung. Somit zeigen diese Polymere in besonderem Maße ebenfalls als Trägersubstanzen Eigenschaften, die nicht nur dem Anforderungsprofil biokompatibler und bioabbaubarer Polymersysteme entsprechen, sondern die auch durch geringfügige Variation in der Herstellung den besonderen Anforderungen eines Therapeutikums, insbesondere auch zur mucosalen Wirkstoffverabreichung leicht angepaßt werden können.

Überraschenderweise wurden selbst für die unmodifizierten, somit keine eindeutigen Polyelektrolyteigenschaften besitzenden, erfahrungsgemäßen Kolloide hohe Wirkstoffassoziation (Beladungen) gefunden, die eigentlich nicht zu erwarten gewesen wären, des Weiteren ließ sich der Beladungsgrad durch gezielte Auswahl des Trägerpolymers (Komponente 1) manipulieren und optimieren.

Es war ferner überraschend, daß sich bei der Herstellung solcher Komplexe feine Partikel mit steuerbarer Größe von nm-bis hin zum um-Bereich bildeten und nicht – wie eigentlich zu erwarten war – nur eine verklumpte Masse.

Dabei sind Partikelgrößen, bewußt im Bereich von unter 100 nm bis zu einigen μm gehalten, und Teilchengröße-/verteilung leicht einstellbar, beispielsweise über die Wahl des/der Trägerpolymere, der eingesetzten Konzentrationen, Salzkonzentrationen, Ionenstärken, pH-Werte, Temperaturen, etc. Die erforderlichen Parameter können dabei in entsprechenden Vorversuchen leicht ermittelt und an die gewünschte Anforderung eines Therapeutikums, insbesondere auch zur mucosalen Wirkstoffabreicherung angepaßt werden.

Weiterhin war überraschend, daß mit Hilfe derartiger komplexartiger Assoziate hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen auf relevanten Zellgeweben erzeugt werden können.

30 Erfindungsgemäß lassen sich derartige selbstassemblierenden kolloidalen Systeme besonders gut durch erfindungsgemäße Polymer-Wirkstoff-Komplexe herstellen. Über äußere Einflüsse, wie Lösungsgleichgewichte, Ladungswechselwirkungen, pH-Änderungen, etc. kann weiterhin, sofern aus therapeutischer Sicht erforderlich, in vivo ein langsames Dekomplexieren, also Wirkstofffreigabe erreicht werden. Diese Freigabebedingungen können ebenfalls wie die Konsistenzigenschaften über die Komplexzusammensetzung gesteuert werden.

35 Die Vorteile derartiger sich spontan aus wäßrigen Lösungen ausbildenden Systemen liegen auf der Hand, u. a. sind keine besonderen Herstellungstechnologien nötig, es sind nicht zwingend, die Eigenschaften des Therapeutikums mindernden Hilfsstoffe, wie z. B. organische Lösungsmittel, Emulgatoren etc. notwendig, wodurch erfundungsgemäß ein schneller, reproduzierbarer und kostengünstiger Weg gefunden wurde, effiziente Therapeutika zu erhalten, insbesondere auch im Hinblick auf mucosale Wirkstoffverabreichung.

40 [II] Herstellung und Beladung erfindungsgemäßer kolloidaler Trägersysteme mittels modifizierter Solvent-Deposition

(Lösung Aufgabe 2 – Methode 2, für lipophile Polymere)

45 Da, wie bereits ausgeführt, die meisten Herstellungstechniken besonders für sensitive Wirkstoffe ungeeignet sind, wird zur Herstellung des erfindungsgemäßen Trägersystems weiterhin eine adaptierte und optimierte sogenannte Solvent-Deposition-Methodik bevorzugt, mit der erfindungsgemäße Kolloide leicht und reproduzierbar hergestellt werden können, sofern die Verwendung eines lipophileren, somit nicht mehr wasserlöslichen Trägerpolymers erwünscht bzw. erforderlich ist.

Diese Herstellungsmethodik, die sich von der 1986 von Fessi eingeführten Nanopartikel-Herstellungsmethode [USP 5118528, USP 5049322] ableitet, basiert auf der kontrollierten Fällung eines gelösten Polymers in einem Nichtlösungsmittel und erlaubt somit die Herstellung von partikulären Systemen im Mikron- und Submikrongrößenbereich ohne vorgeschaltete Emulsifikations- bzw. Dispergierschritte. Sie wurde für erfundungsgemäße Trägersysteme, insbesondere auch zur mucosalen Wirkstoffverabreichung durch Wahl des geeigneten Polymer/Lösungsmittel/Nichtlösungsmittel/(Emulgator)-Systems optimiert.

Dabei wurden auch hier Partikelgrößen erfahrungsgemäß bewußt auf einen Bereich von unter 100 nm bis zu einigen µm eingestellt. Auch die Breite der Teilchengrößenverteilung ist leicht einstellbar, beispielsweise über die Konzentration der eingesetzten Polymerlösung, die Zugabegeschwindigkeit, Emulgatoranteil und durch geeignete Auswahl eines in definierten Anteilen zugesetzten Kosolvenz. Auch diese Parameter können in entsprechenden Screenings leicht ermittelt und an die gewünschte Anfordernis angepaßt werden, insbesondere konnten sie dadurch für die erfahrungsgemäß mu-

Dabei wurde gefunden, daß sich der Größenbereich von unter 500 nm Durchmesser erfundungsgemäß besonders gut zur Mukosalapplikation eignet, sich eine erhöhte Wirkstoffkonzentration auf relevanten Zellen einstellte, sowie *in vivo* eine entsprechende Immunantwort erzielen ließ.

65 Mit erfundungsgemäßen Polyolestern lassen sich derartige kolloidale Trägersysteme besonders gut herstellen. Aufgrund der gezielt manipulierten Eigenschaften der Trägerpolymere wurde weiterhin überraschenderweise gefunden, daß auf den Einsatz von zusätzlichen Emulgatoren zur Stabilisierung völlig oder weitestgehend verzichtet werden konnte, was nicht nur die gleichzeitige Erhaltung der gezielt eingestellten Oberflächeneigenschaften des erfundungsgemäßen Trä-

DE 198 39 515 A 1

gersystems ermöglichte, sondern auch die Zahl der einzusetzenden Komponenten/Verfahrensschritte reduziert und somit die Herstellung vereinfacht und verbilligt.

Die Assoziation dieses Systems mit Wirkstoff(en) kann auf wenigstens fünf Arten erfolgen:

1. durch Adsorption des Wirkstoffs aus einer Lösung, mit der die bereits hergestellten Polymer-Kolloide nach Lösungsmittelentz. in Kontakt kommen
2. durch in-situ-Adsorption des Wirkstoffs aus einer Lösung, mit der die gerade hergestellten Polymer-Kolloide vor Lösungsmittelentz. in Kontakt kommen
3. durch in-situ-Einschluß des Wirkstoffs in die Polymermatrix während der Partikelbildung und anschließendem Lösungsmittelentz.
4. durch kovalente Bindung, wobei der Wirkstoff chemisch an mindestens eine funktionelle Gruppierung des eingesetzten Polymers gebunden ist.
5. durch kovalente Bindung an die Partikelloberfläche, wobei der Wirkstoff chemisch an mindestens eine funktionelle Gruppierung der Partikel gebunden ist.

Wegen der einerseits weit variablen, andererseits sehr spezifisch einstellbaren Eigenschaften zeigen erfundungsgemäße Polymerkolloid-Wirkstoff-Formulierungen Eigenschaftsprofile, die sie insbesondere auch für eine mukosale Applikation prädestinieren.

Dabei ist zusammengefaßt für beide Kolloidherstellungsweisen [(I) und (II)] eine Besonderheit der Erfindung, daß das jeweilige biokompatible und bioabbaubare Trägerpolymer (I) bewußt aus verstoffwechselbaren und somit untoxischen Bausteinen hergestellt ist und gezielt (2) an die jeweils besonderen Erfordernisse des/der Wirkstoffmoleküle, (3) an den angestrebten Wirk- bzw. Resorptionsort sowie Wirkmechanismus und (4) an die Einsatzmöglichkeit eines schonenden Partikelherstellungsverfahren angepaßt werden konnte.

ad (1)

Zur Synthese des Trägerpolymers (Komponente 1) kommen wenigstens eine biokompatible Komponente (Polyole) sowie daran geknüpfte Polyesterfragmente, die durch einfache Hydrolyse im Körper zu im Citratzyklus verstoffwechselbaren Bruchstücken zerfallen, zum Einsatz.

ad (2) und (3)

Durch geeignete und gezielte Auswahl bzw. Modifikation der Polyole (z. B. Typ, Molekulargewicht, Zahl an veresterbaren Hydroxylgruppen, Zahl und Art der ladungstragenden Gruppen, Abstand der ladungstragenden Gruppen vdm Polyolgrundgerüst, etc.) werden die dadurch vorgegebenen Eigenschaften des Polyols systematisch durch gezielte Anknüpfung von Polyesterbausteinen an die Erfordernisse des erfundungsgemäßen kolloidalen Systems angepaßt. Genannt seien dabei exemplarisch: Löslichkeit, Molekulargewicht, Struktur, Ladungsdichte, Partikelloberflächenladung etc.

Ist zur gewünschten Wirkstoff-Trägerpolymer-Interaktion (wie z. B. Wirkstoffstabilisierung, Beladungsgrad, etc.) eine hydrophile-hydrophobe Wechselwirkung erwünscht, wird dies durch die gezielte synthetische Einstellung der Polymer-Amphiphilie erreicht, ist eine interionische Wechselwirkung erwünscht, wird dies durch die Auswahl und/oder Modifizierung eines entsprechenden Elektrolyt-Polyols erreicht.

ad (4)

[II] Wenn ein stabiler partikulärer Träger bei lipophileren Wirkstoffen während der Herstellung bzw. bei hydrophileren Wirkstoffen nach der Herstellung des erfundungsgemäßen Trägersystems mit Wirkstoffen assoziiert bzw. verknüpft werden soll, wird die Löslichkeit des Trägerpolymers bewußt so eingestellt, daß ein modifiziertes und optimiertes schonendes sog. Solvent Deposition Verfahren zur Partikelerzeugung zum Einsatz kommen kann.

[I] Wenn auf diesen technologischen Herstellungsschritt verzichtet werden kann bzw. werden soll, wird das Trägerpolymer bewußt wasserlöslich hergestellt, so daß sich bei Vereinigung von Wirkstoff und Trägerpolymer spontan definierte kolloidale Polymer-Wirkstoff-Komplexe in wässriger Lösung ausbilden und deren Eigenschaften, wie z. B. Größe, Beladungsgrad etc. ebenfalls gezielt eingestellt werden können.

Mit Hilfe dieser erfundungsgemäßen neuen kolloidalen, bioabbaubaren polymeren Trägersysteme, die nur durch Kombination aller oben genannter Punkte ihre besondere Wirksamkeit erreichen, sind einerseits völlig neue therapeutische Anwendungsgebiete möglich, andererseits können auch herkömmliche Therapiekonzepte optimiert werden, wie z. B. durch die Erhöhung der therapeutischen Breite und Effizienz eines Wirkstoffes.

Weitere Vorteile, die sich durch die Erfindung ergeben, sind die für den Patienten angenehmere Art der Applikation, da nicht zwingend parenteral, also über eine Injektion, appliziert werden muß, und die damit verbundene erhöhte "Patienten"-Compliance. Hierdurch kann, gegenüber bisherigen Impfverfahren, eine Schutzimpfung z. B. durch Einnahme einer Tablette oder Lösung, ähnlich der Poliomyelitis-Impfung (Kinderlähmung), erfolgen. Der hieraus resultierende niedrigere Durchseuchungsgrad in der Bevölkerung hat einen nicht unerheblichen volkswirtschaftlichen Nutzen, der sich gleichfalls durch die Anwendung erfundungsgemäßer Systeme in der Veterinärmedizin ergibt.

Beispiele

Die Erfindung ist im Folgenden, aber ohne darauf beschränkt zu sein, anhand von einigen ausgewählten Beispielen näher erläutert.

DE 198 39 515 A 1

Polymersynthese

Zentralpolyol-Modifizierung

- 5 Die beispielhafte Modifizierung eines ungeladenen Zentralpolymers, hier Poly(vinylalkohol), erfolgte vergleichbar zu [F. Dolle, J. Le Moigne and P. Gramain, Eur. Polym. J. 6 (1970) 1227-1232; P. Gramain and J. Le Moigne, Eur. Polym. J. 8 (1972) 703-709] über Veretherung dessen aktivierter Hydroxylgruppen mit Butansulton bzw. mit Diethylaminoethylichlorid.

10

Tabelle 1

Bezeichnung	Molekulargewicht [kg/mol]	Substitutionsgrad [%]	Substituent an -OH
PVA	~ 6 (*)	(20)	(-O-COCH ₃)
PVA	~ 15 (*)	(12)	(-O-COCH ₃)
SB03PVA	~ 16	3	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB10PVA	~ 19	10	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB20PVA	~ 23	20	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB30PVA	~ 27	30	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB40PVA	~ 31	40	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB50PVA	~ 35	50	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
DEAE10PVA	~ 18	10	-O-(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂

* Herstellerangabe

35

Abb. 1 zeigt beispielhaft FT-IR-spektroskopisch (Nicolet 510 P FT-IR Spektrometer) die Einführung der Sulfobutylgruppen in das ursprünglich ungeladene Zentralpolymer und die Zunahme der Intensitäten der entsprechenden SO-zugehörigen Schwingungen bei 1190, 1040 und 610 cm⁻¹.

40

Abb. 2 zeigt die entsprechenden Modifizierungen NMR-spektroskopisch (Jeol GX400 Delta N FT-NMR. Spektrometer), z. B. durch Reduktion der Signalintensität der -CH₂-CH-OH (~ 1,7 ppm) und -CH₂-CH-OH (~ 4,1 ppm), Zunahme der Signalintensitäten -CH₂-CH-O-C und -CH-O-CH₂ (~ 1,9 ppm) und der Sulfobutylgruppe selbst bei ~ 3,08 und ~ 3,7 ppm.

45

Melt Grafting zur Herstellung der Trägerpolymere (Komponente 1) durch Anhängen von Hydroxycarbonsäuregruppierungen an die Zentralpolyole

50

Beispielhaft für die Lactone der Milch- und Glycolsäure: D,L-Lactid (dimeres Anhydrid der Milchsäuren) und Glycolid (dimeres Anhydrid der Glycolsäure) werden in definierten molaren Mengen, z. B. 1 : 1, in Gegenwart definierter Mengen des Zentralpolyols, z. B. 1 Gew.-% PVA, bei z. B. 130°C für z. B. drei Stunden unter inertem, wasserfreiem Belebung mit definierten molaren Mengen Katalysator (z. B. 0,2 mmol Zinnoctoat) umgesetzt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und in einem 10 : 1 Überschuß eines damit mischbaren Polymerenlösungsmitels zur Aufreinigung ausgefällt und bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet. Für dieses Beispiel erfolgte das Lösen der Rohproduktes in Dichlormethan (DCM) und die Fällung in Ethanol. Je nach Löslichkeit ergaben sich aber auch Kombinationen Aceton in Wasser oder auch invers Wasser in Aceton. Weitere Einzelheiten s. Tabelle 2.

60

65

DE 198 39 515 A 1

Tabelle 2

Polymer	D,L-LA:GA [mol:mol]	Zentralpolyol*/- menge [Gew.-%]	Reaktions- temp. [°C]	Lösungs- mittel
PVAPLG1	1:1	PVA / 1	130	DCM
PVAPLG10	1:1	PVA / 10	130	Aceton
PVAPLG33	1:1	PVA / 33	140	Aceton/Wasser
PVAPLG50	1:1	PVA / 50	140	Wasser
PVAPLG7.1	1:1	PVA / 57,1	140	Wasser
PVAPLG2.5	1:1	PVA / 62,5	140	Wasser
PVAPLG70	1:1	PVA / 70	140	Wasser
PVAPLA50	1*:0(*L-LA)	PVA / 50	110	Wasser
SB03PVAPLG10	1:1	SB03PVA / 10	140	Aceton
SB10PVAPLG10	1:1	SB10PVA / 10	140	Aceton
SB20PVAPLG10	1:1	SB20PVA / 10	140	Aceton
SB30PVAPLG10	1:1	SB30PVA / 10	140	Aceton
SB40PVAPLG10	1:1	SB40PVA / 10	140	Aceton
SB50PVAPLG10	1:1	SB50PVA / 10	140	Aceton
DEAE10PVAPLG10	1:1	DEAE10PVA / 10	150	Aceton
SB40PVAPLG33	1:1	SB40PVA / 33	140	Aceton/Wasser
SB40PVAPLG50	1:1	SB40PVA / 50	140	Wasser
SB10PVAPLG45	1:1	SB10PVA / 45	140	Wasser
SB10PVAPLG50	1:1	SB10PVA / 50	140	Wasser

Reaktionszeit jeweils 3 Stunden, Katalysator jeweils Zinnoctoat

* entsprechend Tabelle 1

Struktur und Löslichkeit der Polyolester (Komponente 1)

Abb. 3 zeigt NMR-spektroskopisch die strukturelle Veränderung der Polymere in Abhängigkeit der Synthesebedingungen. Hier wurden die Hydroxycarbonsäuregruppierungslängen am Zentralpolymer systematisch verkürzt, um insbesondere die Löslichkeitseinstellbarkeit zu demonstrieren. Während bei PVAPLG10 die Hydroxycarbonsäuregruppierungen, die an die OH-Gruppen des Zentralpolymers gehängt wurden, noch je aus etwa 10 Säurebaueinheiten besteht, erkennbar z. B. an dem Verhältnis der Lactid-Signalintensitäten -CH₃-Kette : -CH₃-Endgruppe, also bei ~ 1,5 ppm zu ~ 1,3 ppm, sind die Gruppierungen bei PVAPLG50 bereits derart verkürzt, daß sich dieses Trägerpolymer gut in kaltem Wasser löst, allerdings – überraschend gefunden – durch Temperaturerhöhung wieder ausfällbar ist und daher eine Untere Kristische Entmischungstemperatur besitzt.

Abb. 4 zeigt mittels einer Kombination aus Size Exclusion Chromatographie und Statischer Lichtstreuung (Merck-Hitachi-System mit RI 71-Detektor in Kombination mit MiniDawn Light Scattering-Detektor), wie sich diese strukturelle Veränderung entsprechend auch auf das Molekulargewicht der Trägerpolymere im Vergleich zu einem unmodifizierten Zentralpolyol auswirkt.

Abb. 5 zeigt mittels photometrischer Trübungsmessung (Shimadzu UV-VIS Spektralphotometer UV 160) beispielhaft für ungeladene Trägerpolymere, daß sich die überraschend gefundenen Unteren Kristischen Entmischungstemperaturen ebenfalls als Funktion der (Hydroxycarbonsäuregruppierungs)-Kettenlängen definiert einstellen ließen.

Abb. 6 zeigt mittels photometrischer Trübungsmessung beispielhaft hier für ein Ladungsmodifiziertes Trägerpolymer eine weitere Manipulationsmöglichkeit der Lage der Unteren Kristischen Entmischungstemperatur über die Konzentration des Polymers im Wäßrigen.

Abb. 7 zeigt mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie [PCS, Malvern Zetasizer 4], beispielhaft hier für ein ladungsmodifiziertes Trägerpolymer, die Größe der reinen Trägerpolymerassoziate in Abhängigkeit der Temperatur, was eine Möglichkeit demonstriert, die Eigenschaften der Polymer-Wirkstoff-Komplexe zu steuern. Besonders für sehr empfindliche Wirkstoffe (genannt seien exemplarisch Wachstumsfaktoren) kann dem Wirkstoff bereits bei niederen Temperaturen ein partikuläres Trägerpolymerassoziat im Wäßrigen (vergleichbar einem micellarem System) angeboten werden, an dessen Oberfläche dann der Wirkstoff selbst assoziiert wird.

Spontan ausgebildete Polymer-Wirkstoff-Komplexe im Wäßrigen

Generelles Vorgehen für die nachfolgende Beispiele: Eine definierte Menge einer Wirkstoffstammlösung wird vorgelegt, mit definierter Menge Puffer verdünnt, anschließend mit einer definierten Menge Polymerstammlösung versetzt, so daß sich wenn nicht explizit anders angegeben ein Gesamtvolumen von 1 ml ergibt.

5 Abb. 8 zeigt die Möglichkeit, die Größe derartiger Polymer-Wirkstoff-Komplexe über die eingesetzte Polymerkonzentration zu steuern (Wirkstoff: Fluoreszenzmarkiertes Modellprotein FITC-BSA (Bovines Serumalbumin) 640 µg; Polymer PVAPLG50; isotonischer Phosphatpuffer pH 6.0 (PBS 6.0), Größenmessung per PCS).

10 Abb. 9 zeigt beispielhaft die leichte Einstellbarkeit der Polymer-Wirkstoff-Komplex-Eigenschaften über "Verfahrens"-parameter wie pH-Wert und/oder Ionenstärke der wäßrigen Lösungen (Wirkstoff: Tetanus Toxoid, Menge für dieses factorial Design variiert in den Grenzen 332 µg . . . 949 µg/200 ml, Polymer: PVAPLG57.1 1670 µg/200 ml, Größenmessung per PCS, Zetapotentialmessung mit Malvern Zetasizer 4).

15 Abb. 10 zeigt beispielhaft, daß – wenn erwünscht – auch die Zugabe eines Emulgators eine Möglichkeit darstellt, die Polymer-Wirkstoff-Komplex-Eigenschaften zu beeinflussen (Wirkstoff: Tetanus Toxoid 3.367 mg; Polymer: PVAPLG57.1 3.32 mg; in zusammen 1,220 ml PBS 6.0, Emulgator Pluronik F68 BASF).

20 Abb. 11 zeigt beispielhaft, wie durch die Auswahl des Trägerpolymers und dessen eingesetzter Menge das Gesamtsystem, also Polymer-Wirkstoff-Komplex, für einen Wirkstoff optimierbar ist. Wird ein ungeladenes Zentralpolyol mit Hydroxycarbonsäuregruppierungen synthetisch versehen, werden bei ausreichend hoher Konzentration dieses Trägerpolymers im Wäßrigen zwar bereits 90% des eingesetzten Modellwirkstoffes (FITC-BSA, 450 µg, Gesamtflüssigkeitsvolumen: 1 ml PBS 6.0) in Form der erfindungsgemäßen Polymer-Wirkstoff-Komplexe gebunden, wird aber ein Zentralpolyol mit nur 10% ladungstragenden Gruppen zur Synthese der Komponente 1 eingesetzt, wird die gesamte Menge des eingesetzten Proteins assoziiert. Ist derartig das erwünschte Polymer einmal gewählt, kann darüberhinaus über dessen eingesetzte Menge jede beliebige Menge des eingesetzten Proteins in Form der Polymer-Wirkstoff-Komplexe assoziiert werden.

25 Abb. 12 zeigt, daß – wenn therapeutisch sinnvoll – auch ein Dekomplexieren/Freisetzen von Wirkstoffen, hier beispielhaft Tetanus Toxoid, aus den Polymer-Wirkstoff-Komplexen erreicht werden kann. Freisetzung, die hier beispielhaft durch die Auswahl des Trägerpolymers gesteuert wurden. Des Weiteren zeigt dieses Beispiel, daß insbesondere bei erfindungsgemäßer mucosaler Anwendung dieser Systeme, innerhalb der ersten Stunden noch keine signifikanten Mengen Protein abgegeben werden, so daß der mucosale Zielort erreicht werden kann, und erst dort eine Abgabe des Wirkstoffes stattfindet (Photometrische Gehaltsbestimmung bei 280 nm, Menge Komponente 1 (Trägerpolymere) jew. 10 mg, Menge Komponente 2 (Tetanus Toxoid) jew. 1992 µg, jew. in insgesamt 1000 µl PBS 6.0, nach spontaner Bildung der Polymer-Wirkstoff-Komplexe wurden diese zu angegebenen Zeiten bei 44°C abzentrifugiert, der Überstand photometrisch untersucht, anschließend wurden die Komplexe in frischem PBS 6.0 bei 37°C weiterinkubiert).

30 Abb. 13 zeigt, hier am Beispiel eines Komplexes zwischen einem ladungstragenden Trägerpolymer und dem Modellprotein FITC-BSA, die massive Anreicherung der Komplexe auf mucosalähnlichem Zellgewebe (Caco 2-Zellkultur), ein Phänomen, das sich bei Verwendung von freien Wirkstoffen allein nicht erzeugen läßt und somit eindeutig die überraschend gefundene Effektivität des erfindungsgemäßen neuen Trägersystem demonstriert (640 µg Protein, 10 mg Polymer, in zusammen 1000 µl PBS 6.0)

Kolloide

40 Wenn die Verwendung eines Trägerpolymers erwünscht ist, dessen hydrophile-hydrophobe Balance mehr auf die Seite der Lipophilie verschoben ist, z. B. aus Kompatibilitätsgründen zum Wirkstoff oder wenn sich der relevante Wirkstoff ausschließlich definiert auf der Oberfläche des kolloidalen Trägers befinden soll, kann bei entsprechender Polymergesamtzusammensetzung dann ein acetonlösliches Trägerpolymer hergestellt und gemäß modifizierter Solvent Deposition Methodik in den erfindungsgemäßen kolloidalen Träger überführt werden. Beispielhafte Herstellungsbeschreibung (Herstellungsparameter können zur Eigenschaftsoptimierung davon abweichen): 50 mg Polymer werden in 5 ml Aceton (kann Kosolvenz enthalten) gelöst. Die Lösung wird mit konstanter Zugabe rate in 50 ml PBS gegeben (kann anteilig Emulgator enthalten). Die entstehende Suspension wird kontinuierlich dispergiert. Nach der Zugabe wird das organische Lösungsmittel 8 h unter Rühren evaporisiert.

45 Abb. 14 demonstriert am Beispiel eines ungeladenen bioabbaubaren Polymers eine Möglichkeit die Größe derartiger über kontrollierte Fällung hergestellter Partikel zu variieren, hier über den anteiligen Zusatz eines toxikologisch unbeknownlichen Kosolvenz (Ehylacetat) in der Trägerpolymeracetonlösung.

50 Abb. 15 verdeutlicht, hier am Beispiel eines geladenen Trägerpolymers SB50PVAPLG10, die Morphologie und Größe derartiger Kolloide (transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Photografie).

Abb. 16 demonstriert beispielhaft die Möglichkeit, aufgrund des amphiphilen Charakters der Trägerpolymere auch bei der Solvent Deposition Methodik nicht nur ohne Emulgatorzusatz (Emulgator hier PVA(18.88), Hoechst) arbeiten zu können, sondern auch den dadurch möglichen Erhalt der Oberflächeneigenschaften der Kolloide.

55 Abb. 17 zeigt beispielhaft, daß die Kolloidoberflächeneigenschaften als Funktion der Trägerpolymere, genauer der Wahl des zum Melt Grafting verwendeten Zentralpolyols und dessen Eigenschaften in Kombination mit geeigneter Hydroxycarbonsäuregruppierungsmodifikation, einstellbar sind – hier beispielhaft aufgeführt: Oberflächenladung der Kolloide (Zeta-Potentialmessung sowie Particle Charge Detection (PCD)-Titration) sowie deren Hydrophobizität (Bengal-Adsorptions-Methode).

60 Abb. 18 demonstriert, daß auch der Beladungsgrad derartiger Kolloide mit relevantem Wirkstoff eine direkte Funktion der Trägerpolymere, genauer der Wahl des zum Melt Grafting verwendeten Zentralpolyols und dessen Eigenschaften in Kombination mit geeigneter Hydroxycarbonsäuregruppierungsmodifikation, ist.

65 Abb. 19 zeigt die hohe Effektivität der erfindungsgemäßen Kolloide, hier beispielhaft für nilrotmarkierte SB30PVAPLG10-Kolloide im Zellkulturmödell (Konfokale Lasermikroskopie), nicht nur auf (apikal), sondern auch in

DE 198 39 515 A 1

und sogar basal findet man eine hohe fluoreszierende Assoziation (optische Zellschnittebenen in Abb. 19 von links nach rechts etwa 0 µm, 10 µm, 20 µm).

Abb. 20 untermauert diesen Befund, da die zelladsorbierte und zellabsorbierende Kolloid-Menge wieder eine Funktion der Trägerpolymere darstellt, genauer der Wahl des zum Melt Grafting verwendeten Zentralpolyols und dessen Eigen-
schaften in Kombination mit geeigneter Hydroxycarbonsäuregruppierungsmodifikation.

5

Toxizität und Wirkstoffstabilität

Abb. 21 demonstriert die toxikologische Unbedenklichkeit erfundungsgemäßer Kolloide, gemäß MTT-Assay bleibt eine Zellviabilität von 100% erhalten, d. h. kein Zellabsterben durch die Kolloide ist erkennbar, auch bezüglich der LDH-Freisetzung verhalten sich die Kolloide neutral. Bei dem Propidiumiodid-Versuch wird dieser Befund ebenfalls untermauert, weniger als 0,2% der Zellen starben bei Inkubation mit den Kolloiden, ein Wert, der dem von reinem wäßrigen Puffermedium entspricht.

Abb. 22 zeigt das Ergebnis von Gel Elektrophorese (GE) Versuchen (Native PAGE und SDS PAGE), die die Unverändertheit des Wirkstoffes demonstrieren, sowohl im Polymer-Wirkstoff-Komplex, als auch davon desorbiert Wirkstoff nach 24 Stunden zeigen keine Veränderungen im Vergleich zu freiem unbehandelten Wirkstoff (1 = freies unbehandeltes Modellprotein FITC-BSA; 2 = Polymer-Wirkstoff-Komplex: SB10PVAPLG50-FITC-BSA-Komplex; 3 = von 2 nach 24 h desorbiertes FITC-BSA).

10

15

20

Generelle Methodenbeschreibung Zellversuche

25

Bestimmung der Zytoadhäsion und Zytotoxizität

Voraussetzung für eine Applikation von kolloidalen Arzneistoffträgern, insbesondere auch mucosale Applikation, ist neben einer nur geringen toxischen Wirkung auf das umgebende Gewebe (Epithelzellen), auch eine ausreichend lange Verweilzeit auf mukosalen Oberflächen (Zytoadhäsion) sowie eine eventuell erforderliche ausreichende zelluläre Aufnahme. Zur Untersuchung der Wechselwirkung mit mucosalen Zellen wurde das Caco 2 Zellkulturmödell herangezogen. Dieses in vitro-Modell der intestinalen Mucosa hat bereits in vielen Untersuchungen seine Eignung zum Studium von intestinaler Resorption, Cytoadhäsion und Toxizität von Arzneistoffen und Arzneistoffträgersystemen zeigen können.

30

Zellkultur

Caco 2 Zellen der Passagen 42 bis 45 wurden kultiviert in Dulbecco Modified Eagles-Medium mit einem Glucosegehalt von 4.5 g/l unter Zusatz von 10% Fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 1% Nichtessentieller Aminosäuren in 10%iger CO₂-Atmosphäre bei 95% RF und 37°C.

35

Toxizitätsuntersuchungen

40

Caco 2 Zellen wurden in einer Zelldichte von 6.5×10^4 Zellen/cm² auf Polystyrol-Multiwell-Platten ausgesät. Medi-umwechsel erfolgte alle 2 Tage. Am Tag 21 nach Aussaat haben die Zellen eine differenzierte Monozellschicht ausgebildet und sind für in vitro Untersuchungen nutzbar.

Hierzu wurden Zellen 2x gewaschen mit isotonischer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS, pH 7.2) und entsprechende erfundungsgemäßen Kolloid-Suspensionen (0.25, 2.5 mg/ml) auf die Zelloberfläche aufgebracht. Nach mehrstündiger Inkubation (Zeitintervalle gemäß Abbildungen) wurden die nachfolgend genannten Toxizitätsprüfungen durchgeführt.

45

1. Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH)

50

Prinzip: Als cytoplasmatisches Enzym tritt LDH bei einer Schädigung der Plasmamembran aus dem Zellinnern in das Außenmedium (Puffer) über und kann mittels kinetischer Bestimmungsmethoden gegen einen Standard UV-photometrisch quantifiziert werden. Als toxischer Referenz-Standard dient Triton X 100 (0.1%ig in PBS), dessen LDH-Freisetzung 70% entspricht.

55

2. Transformation von MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

55

Prinzip: Die Tetrazolverbindung MTT wird in Mitochondrien noch lebensfähiger Zellen zu einem blaugefärbten Formazanfarbstoff enzymatisch reduziert. Die Blaufärbung ist dabei proportional zur Viabilität der Zellen und wird photometrisch erfaßt, als untoxische Referenz dient PBS.

60

3. Propidium-Iodid-Färbung

65

Prinzip: Propidiumiodid durchdringt als hydrophile Substanz nur geschädigte Zellmembranen und bindet an Nukleinsäuren des Kerns, wodurch es bei UV-Anregung zu einer roten Kernfluoreszenz kommt, die mikroskopisch erfaßbar ist. Die Auswertung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch mit Wellenlängenfilter (380/550) gegen einen untoxischen PBS-Standard.

Zytoadhäsion und zelluläre Aufnahme

Caco 2 Zellen wurden in einer Zelldichte von 6.5×10^4 Zellen/cm² auf Polycarbonatmembranen (Costar-Transwell) ausgesät. Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Am Tag 21 nach Aussaat haben die Zellen einen differenzierten Monolayer ausgebildet und können für Adhäsions- und Aufnahme-Untersuchungen verwendet werden.

Mit Nilrot (1%, w/w) fluoreszenzmarkierte Kolloide sowie Polymer-Wirkstoff-Komplexe (Wirkstoff: mit Fluorescein-Isothiocyanat markiertem Rinderserumalbumin (FITC-BSA)) wurden auf die apikale Oberfläche der Zellen appliziert und für 120 min bei 37°C, 95% RF, 10% CO₂ inkubiert. Die Kolloidkonzentration betrug in beiden Fällen 250 µg/ml.

Nach Inkubation wurden die Zellmonoschichten 3 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Formalinlösung (4%ig in PBS) 60 min lang fixiert. Die Filtermembranen wurden mittels Skalpell herausgeschnitten und in Glycerol-Gelatine eingebettet. Die so hergestellten Präparate wurden mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) auf adhäsive und intracytoplasmatische Fluoreszenz untersucht.

Bei Kontrollen nur mit Wirkstoff ohne Kolloide bzw. Komplexe war keine Fluoreszenz auf bzw. in den Zellen nachweisbar.

15

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend wenigstens ein kolloidales Polymer-Wirkstoff-Assoziat.
2. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1, insbesondere auch zur mucosalen Wirkstoffverabreichung.
3. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Komponente ein biokompatibles und bioabbaubares Polymer ist (Komponente 1).
4. Kolloidales Assoziat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Polymer-Wirkstoff-Komplex handelt.
5. Kolloidales Assoziat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß spontane in-situ Ausbildung von kolloidalen Polymer-Wirkstoff-Komplexen erfolgt, wenn eine wäßrige Lösung A mit Komponente B vereinigt wird, wobei Lösung A wenigstens Komponente 1 enthalten muß und Komponente 8 wenigstens ein Wirkstoff (Komponente 2) ist oder diese(n) in chemisch gebundener oder physikalisch assoziierter Form enthält und Komponente B dabei a) selbst Bestandteil von Lösung A oder b) eine zweite Lösung sein kann.
6. Kolloidales Assoziat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung insbesondere über die Wahl der Komponente 1, sowie Verfahrensparameter: Konzentrationen, pH-Werte, Ionenstärken und/oder Temperatur wirkstoff-, wirkart- und wirkortoptimiert bzw. optimierbar ist.
7. Kolloidales Assoziat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der polymere Träger durch kontrollierte Fällung in kolloidale Form überführt wird.
8. Kolloidales Assoziat gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Assoziation mit Wirkstoffen erfolgt:
 - a) durch Adsorption des Wirkstoffs aus einer Lösung, mit der die bereits hergestellten Polymer-Kolloide nach Lösungsmittelentzündung in Kontakt kommen, und/oder
 - b) durch in-situ-Adsorption des Wirkstoffs aus einer Lösung, mit der die gerade hergestellten Polymer-Kolloide vor Lösungsmittelentzündung in Kontakt kommen, und/oder
 - c) durch in-situ-Einschluß des Wirkstoffs in die Polymermatrix während der Partikelbildung und anschließendem Lösungsmittelentzündung, und/oder
 - d) durch kovalente Bindung, wobei der Wirkstoff chemisch an mindestens eine funktionelle Gruppierung des eingesetzten Polymers gebunden ist, und/oder
 - e) durch kovalente Bindung an die Partikeloberfläche, wobei der Wirkstoff chemisch an mindestens eine funktionelle Gruppierung der Partikel gebunden ist.
9. Kolloidales Assoziat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 7 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung insbesondere über die Wahl der Komponente 1, sowie Verfahrensparameter: Konzentrationen, pH-Werte, Ionenstärken, Fällungsgeschwindigkeit, Rührgeschwindigkeit, Kosolventien und/oder Temperatur, wirkstoff-, wirkart- und wirkort-optimiert bzw. optimierbar ist.
10. Pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Wirkstoff(e) ausgewählt wird/werden aus der Gruppe: aktive Peptide, Proteine, Enzyme, Enzyminhibitoren, Antigene, Cytostatika, Antiinflammatorika, Antibiotika, DNA Konstrukte und Wachstumsfaktoren.
11. Pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß kolloidal einen mittleren Teilchengrößenbereich von <1 mm bezeichnet.
12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß kolloidal einen mittleren Teilchengrößenbereich von <10 µm bezeichnet.
13. Pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß kolloidal einen mittleren Teilchengrößenbereich von <1 µm bezeichnet.
14. Pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß kolloidal einen mittleren Größenbereich von 10 bis 10.000 nm bezeichnet, und insbesondere deren Verwendung zur mucosalen Wirkstoffverabreichung, wobei mucosale Wirkstoffverabreichung insbesondere sublinguale, bucale, orale, nasale, pulmonale, vaginale, okulare und/oder gastrointestinale Verabreichung bezeichnet.
15. Verwendung der pharmazeutischen Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 als Impfstoff.
16. Polymere, dadurch gekennzeichnet, daß es verzweigte Polyolester sind, welche aus einem Zentralmolekül bestehen, an das kurzkettige, bioabbaubare Hydroxycarbonsäureestergruppierungen angehängt sind, mit der Besonderheit, daß sie durch Reaktionsparameter: Wahl und Mengen von Zentralpolyol und Katalysator(-system), Wahl und Länge der Hydroxycarbonsäureestergruppierungen, sowie der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit, zur Verwendung als Komponente 1 gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15 optimiert bzw. optimierbar

DE 198 39 515 A 1

sind.

17. Polymere gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die zu ihrer Herstellung nötigen Zentralmoleküle modifizierte oder unmodifizierte Polyole sind.
18. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die zu ihrer Herstellung nötigen Zentralmoleküle ausgewählt werden aus der Gruppe: lineare synthetische Polymere mit >6 bis 500 Hydroxylgruppen, insbesondere Polyvinylalkohole (PVA) mit Polymerisationsgraden von >6 bis 500 (und Verseifungsgraden von 70 bis 98%, sofern durch Hydrolyse von Poly(vinylacetat) erhalten).
19. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die zu ihrer Herstellung nötigen Zentralmoleküle ausgewählt werden aus der Gruppe: lineare synthetische Vinylcopolymeren, insbesondere des Polyvinylalkohols, mit >6 bis 500 Hydroxylgruppen, insbesondere mit Vinylacetat, Vinylpyrrolidonen, Vinylaminen, Vinylimidazolen, Vinylpyridinen, Vinylsulfonsäuren, Vinylphosphorsäuren.
20. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die zu ihrer Herstellung nötigen Zentralmoleküle ausgewählt werden aus der Gruppe: lineare, verzweigte oder cyclische, geladene oder ungeladene Polysaccharide, insbesondere Stärken oder Bestandteile, Glycogene, Cellulosen oder Bestandteile, Dextrane, Tunicine, Inuline, Chitine, Alginate, Pektine, Mannane, Galactane, Xylane und andere Polyosen, Chondroitinsulfate, Heparin, Hyaluronsäure und andere Glykosaminoglykane, Mureine, Dextrine, Cyclodextrine, Chitosane, sowie insbesondere deren teilhydrophobisierten Derivate, wobei Hydrophobisierung durch Methyl- und/oder Ethyl- (-Ether), (-Ester), (-Urethan)-Verknüpfung erreicht ist.
21. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die zu ihrer Herstellung nötigen Zentralmoleküle zusätzlich eine oder mehrere Carboxyl-, Sulfobutyl- oder Sulfopropyl-Gruppe(n) und/oder Butylamin-, Propylamin- oder Ethylamin-(primäres, sekundäres, tertiäres oder quartäres Amin, wobei entsprechende N-Substituenten insbesondere -H, -CH₃ und/oder -C₂H₅-Gruppe(n) darstellen) -Gruppe(n) enthalten können, die in Form von Ether-, -Ester- oder -Urethan-Verknüpfung an das Polymer gebunden sind.
22. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die zu ihrer Herstellung nötigen Zentralmoleküle auch in Form von Alkalimetall- bzw. Halogen-Salze, insbesondere Natrium- bzw. Chloridsalze vorliegen.
23. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxycarbonsäureestergruppierungen aus biologisch unbedenklich geltenden Baueinheiten, insbesondere L-, D-Milch- und/oder Glycolsäure, in beliebigen molaren Mischungsverhältnissen bestehen.
24. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxycarbonsäureestergruppierungen Reaktionsprodukte von Dimeren von biologisch unbedenklichen Hydroxycarbonsäuren sind; Dimere sind dabei insbesondere L-Lactid, D-Lactid, D,L-Lactid und/oder Glycolid in beliebigen molaren Zusammensetzungen.
25. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Einführung von Hydroxycarbonsäureestergruppierungen zur Bildung von wasserlöslichen Polyolestern führt.
26. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie in wäßriger Lösung eine Untere Kritische Entmischungstemperatur besitzen, insbesondere im Temperaturbereich von 0°C bis 100°C.
27. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung molare Verhältnisse Polyol-OH-Gruppe zu Säurebaueinheit im Bereich von 0,6 : 1 bis 6 : 1, insbesondere im Bereich von 1 : 1 bis 3 : 1 vorliegen.
28. Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Einführung von Hydroxycarbonsäureestergruppierungen zur Bildung von nicht-wasserlöslichen Polyolestern führt, dabei aber eine Löslichkeit in untoxischen organischen Lösungsmitteln: Estern, Ethern, Alkoholen, Ketonen, insbesondere Aceton, Ethylacetat, Ethanol und auch insbesondere deren Mischungen, sowie auch insbesondere deren Mischungen mit Anteilen Wasser, resultiert.
29. Polymere gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxycarbonsäureestergruppierungen am Zentralpolyol jeweils aus 1 bis 100, und insbesondere 5 bis 50, Hydroxycarbonsäurebausteinen zusammengesetzt sind.
30. Verwendung der Polymere gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 29 als Komponente 1 gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15.

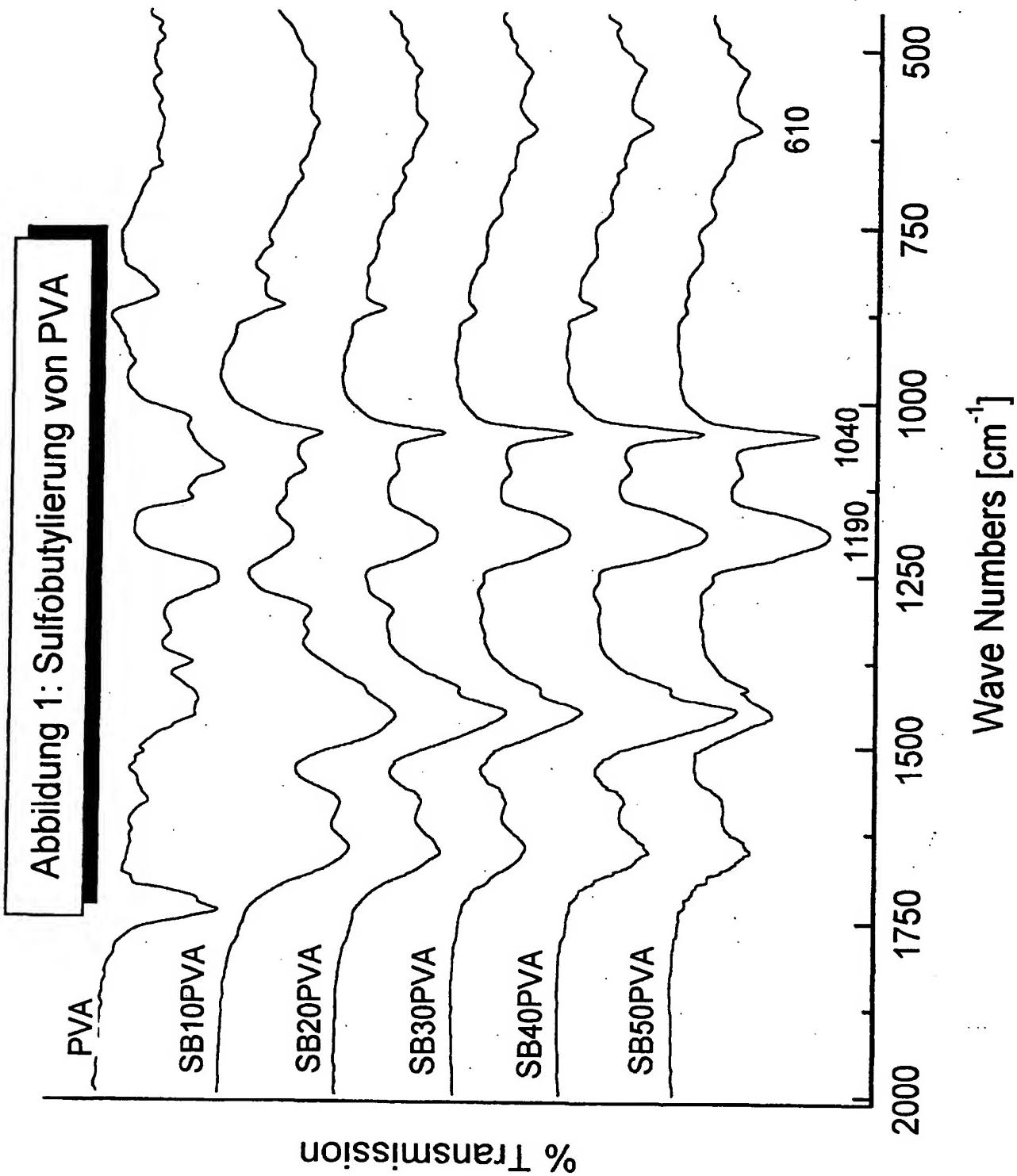
Hierzu 26 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

- Leerseite -



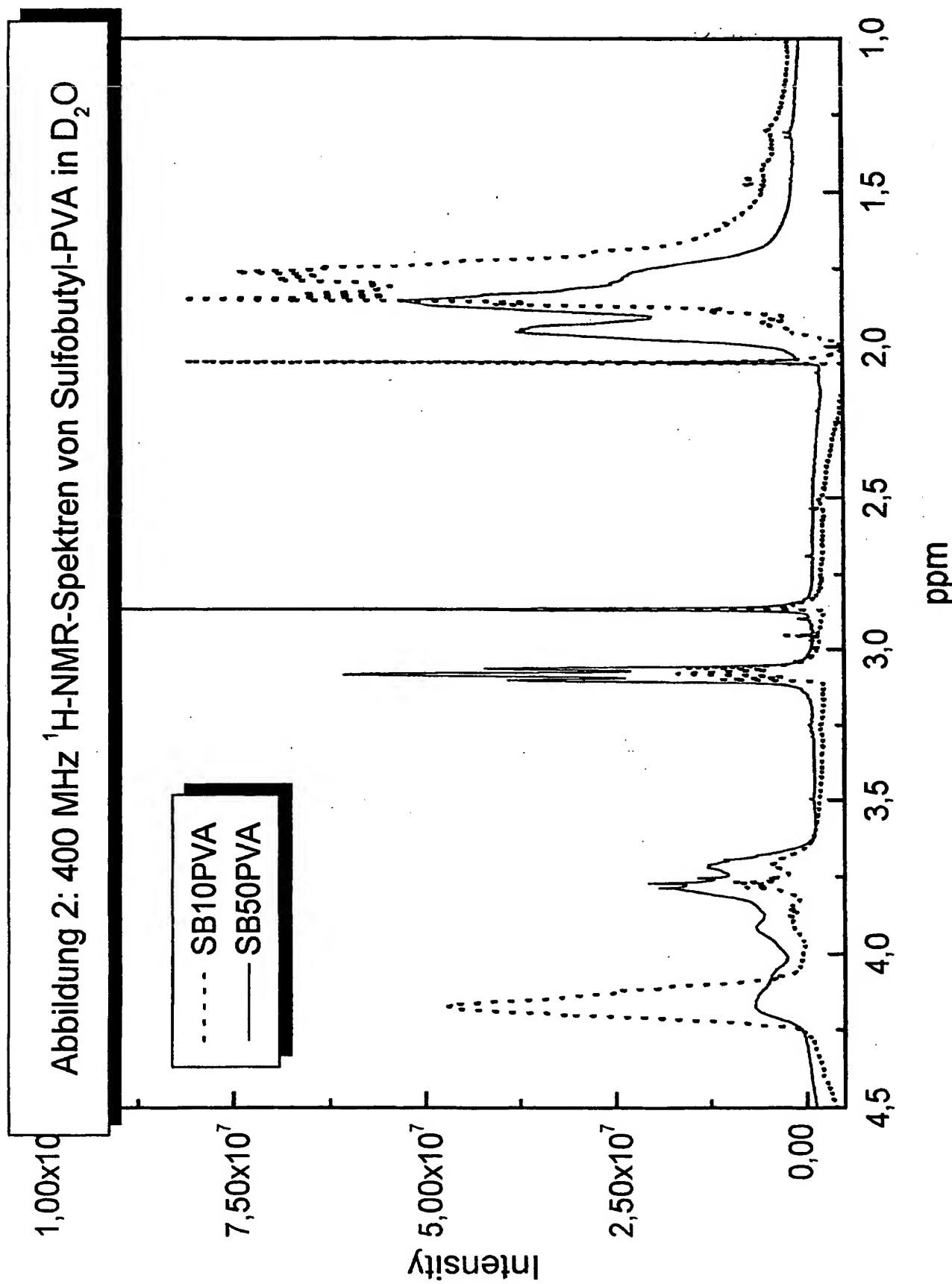


Abbildung 3: Löslichkeit als Funktion der Zusammensetzung
400 MHz ^1H -NMR Spektren von Komponente 1 in DMSO-d_6

PVAPLG50: löslich in Wasser

PVAPLG33: löslich in Aceton-Wasser

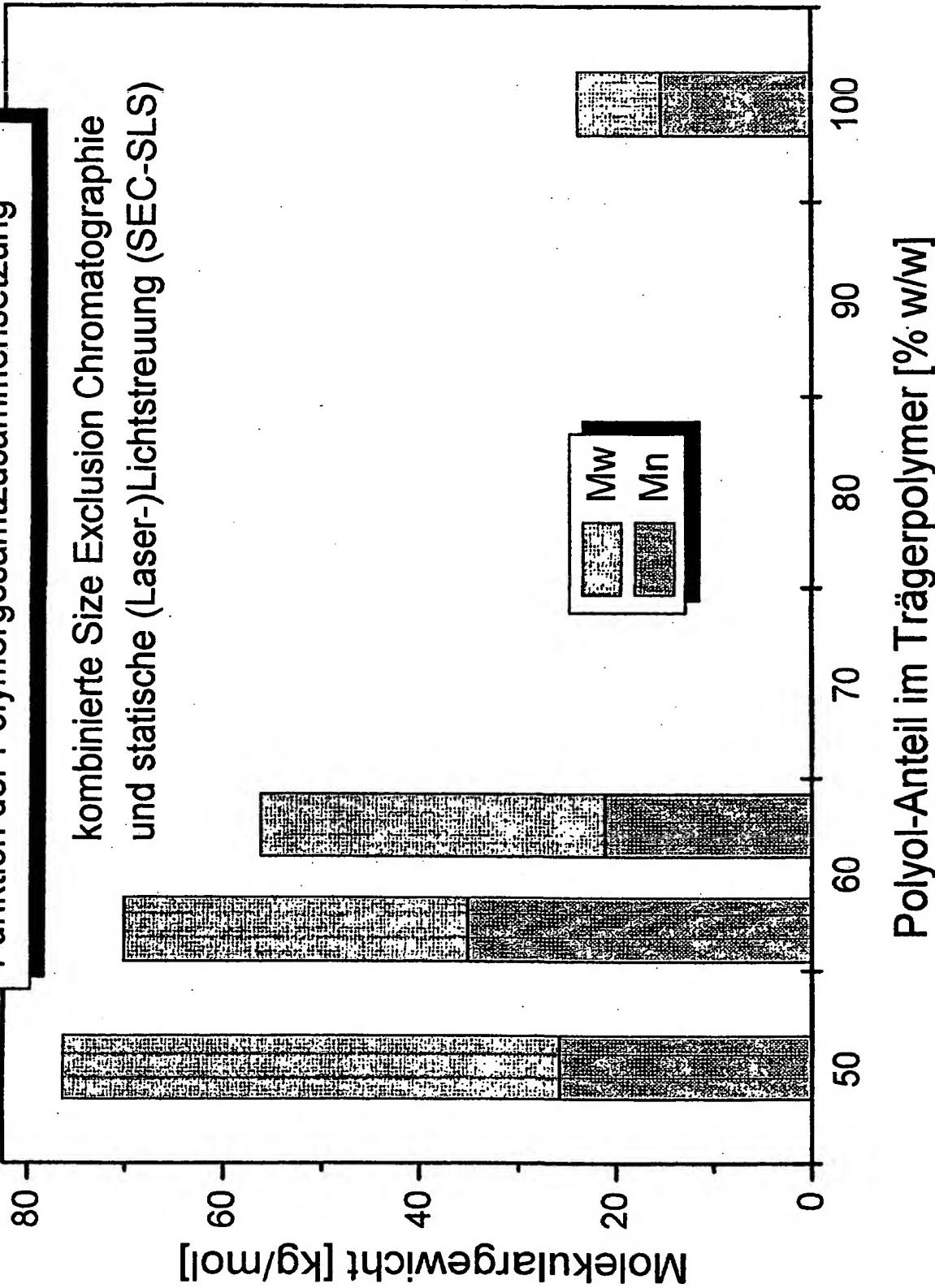
PVAPLG10: löslich in Aceton

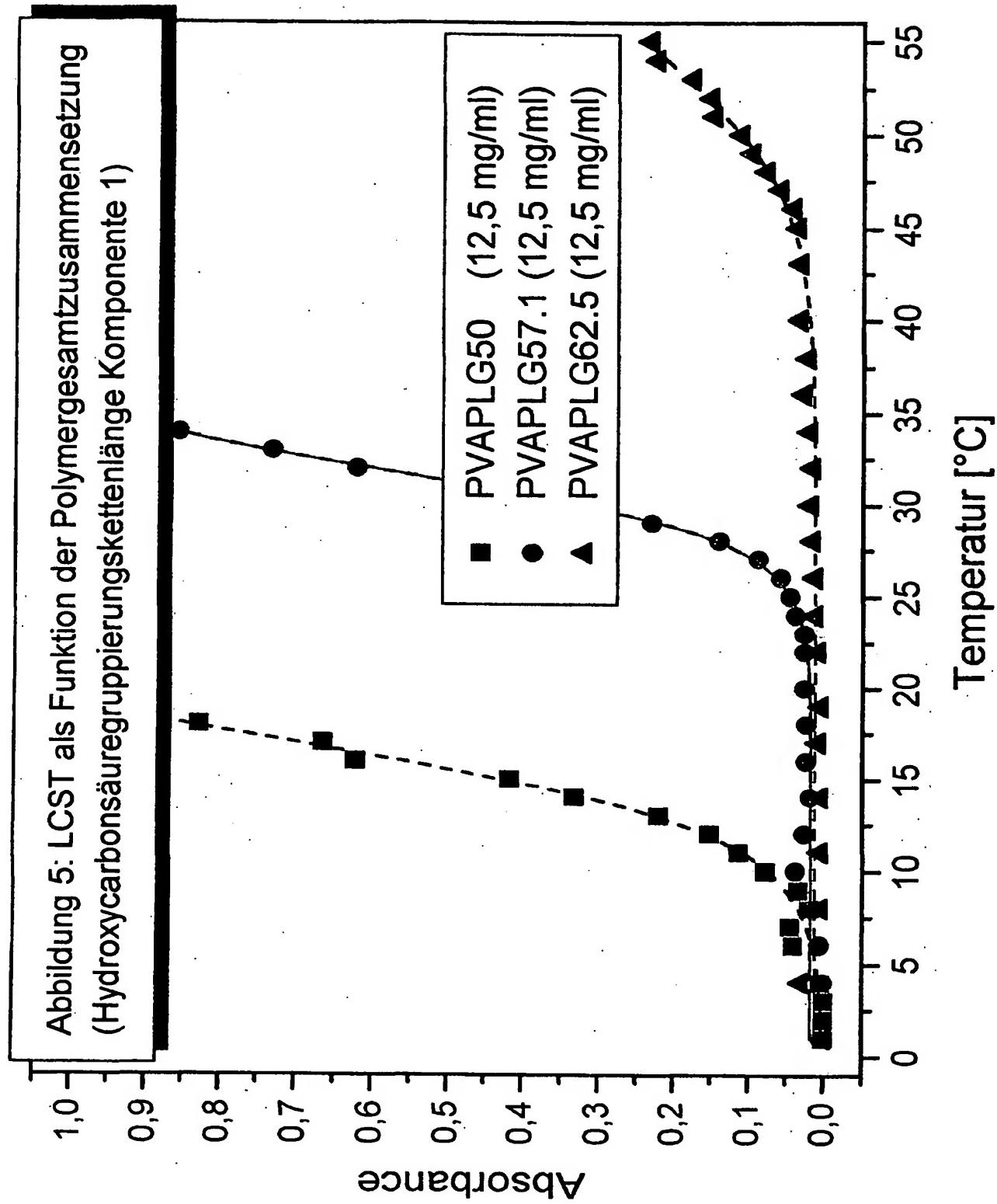
Intensity

902 070/228

Abbildung 4: Molekulargewichte Komponente 1 als
Funktion der Polymergesamtzusammensetzung

kombinierte Size Exclusion Chromatographie
und statische (Laser-)Lichtstreuung (SEC-SLS)





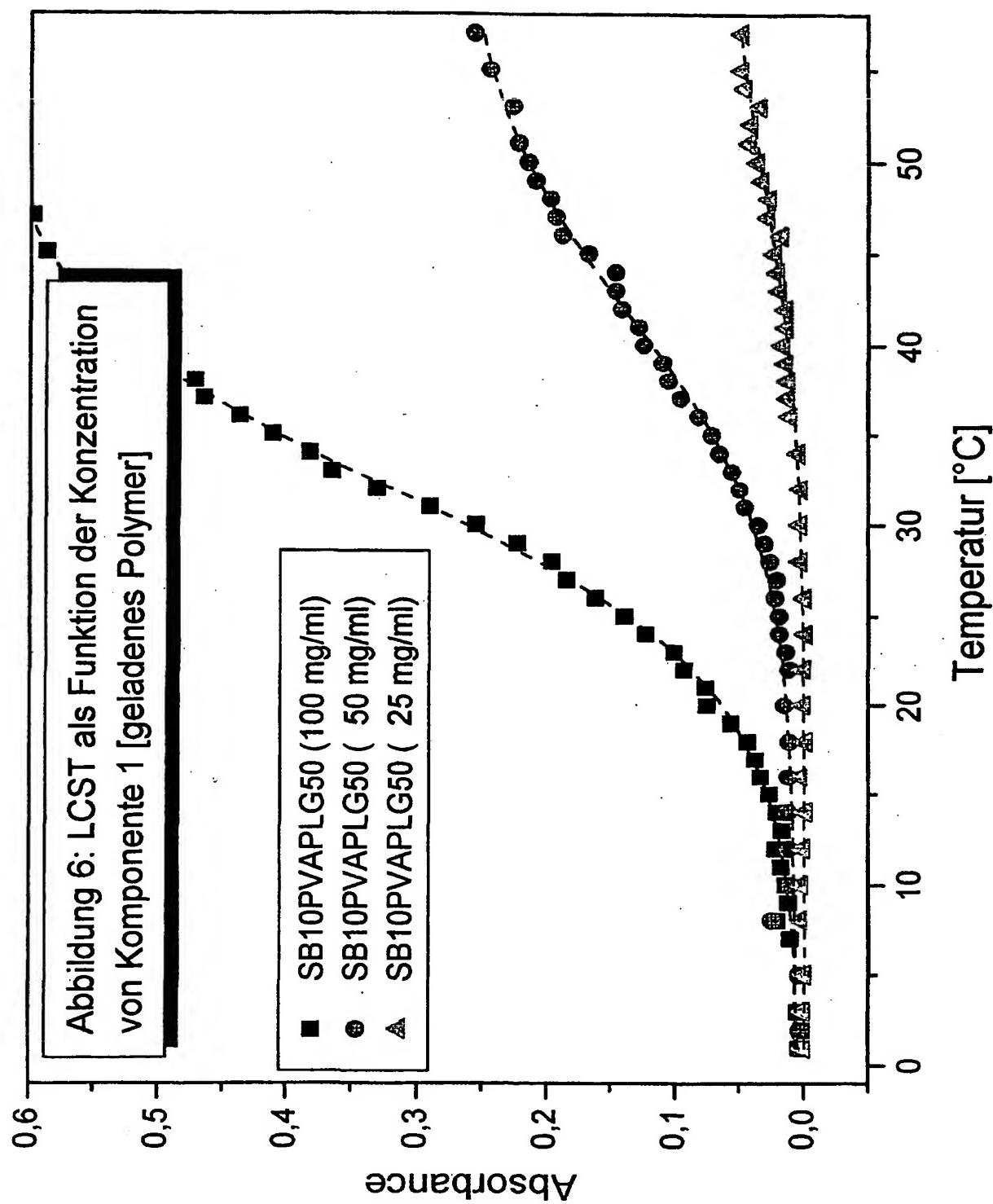
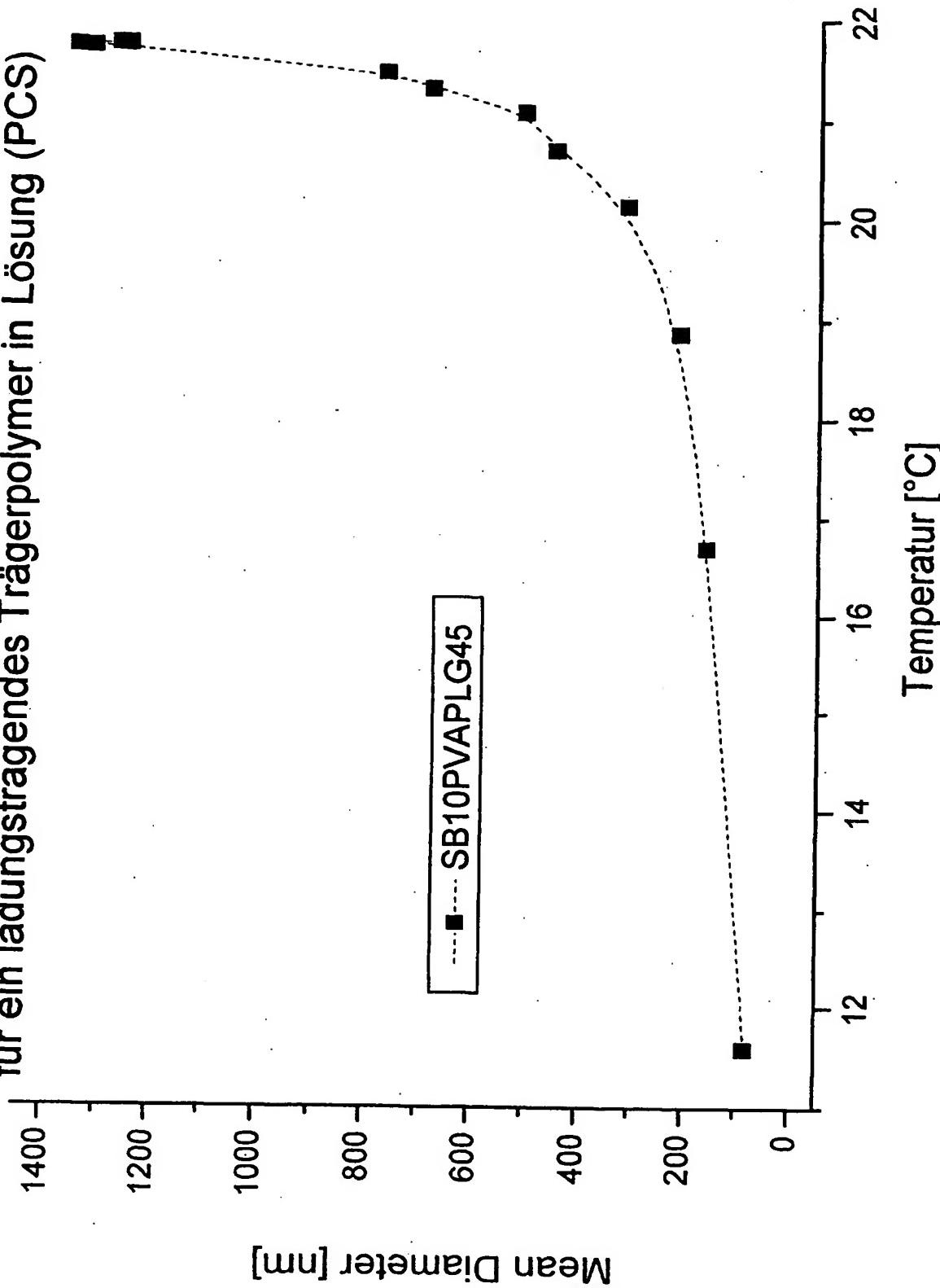


Abbildung 7: Partikelgröße in Abhängigkeit der Temperatur für ein ladungstragendes Trägerpolymer in Lösung (PCs)



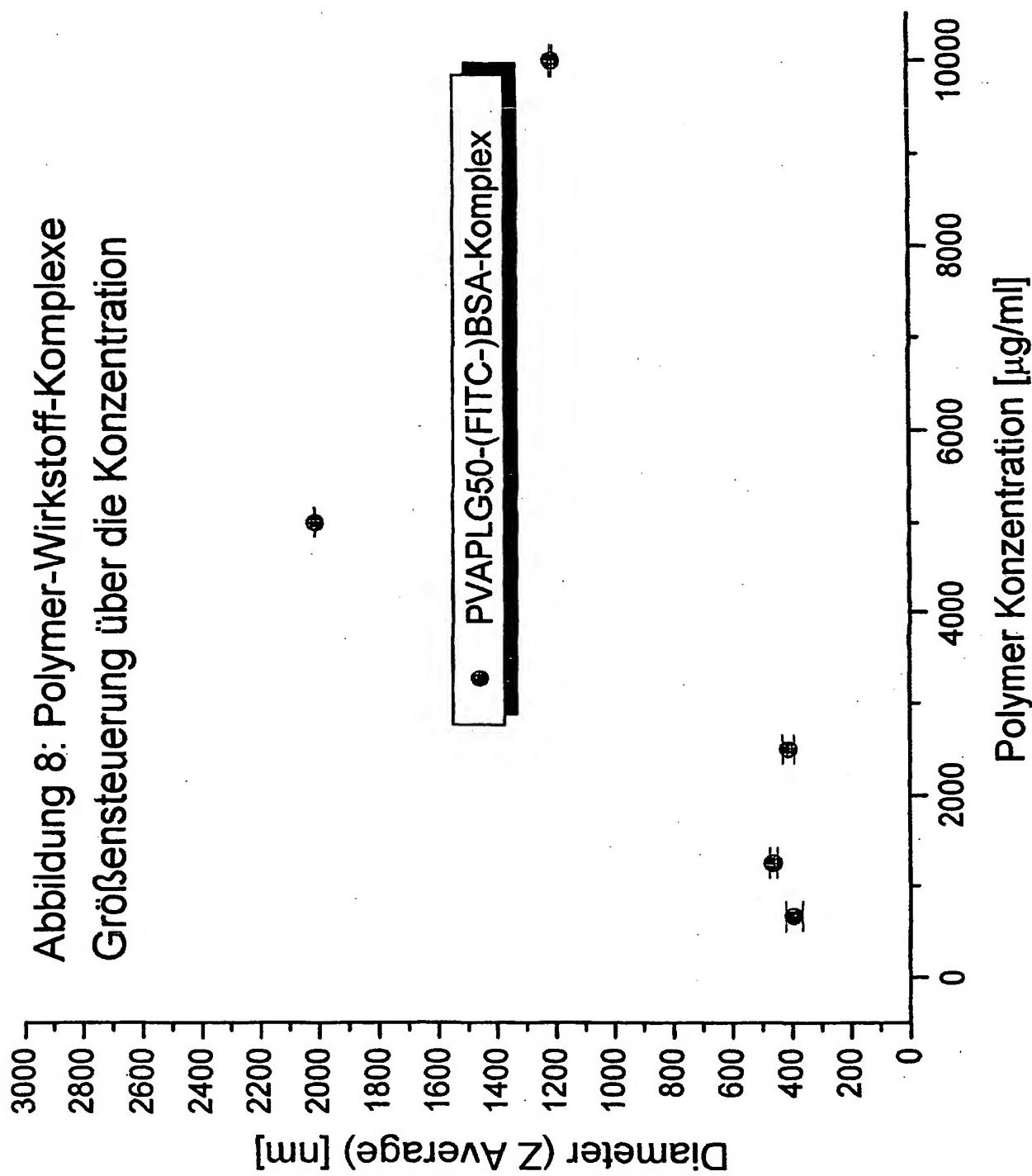
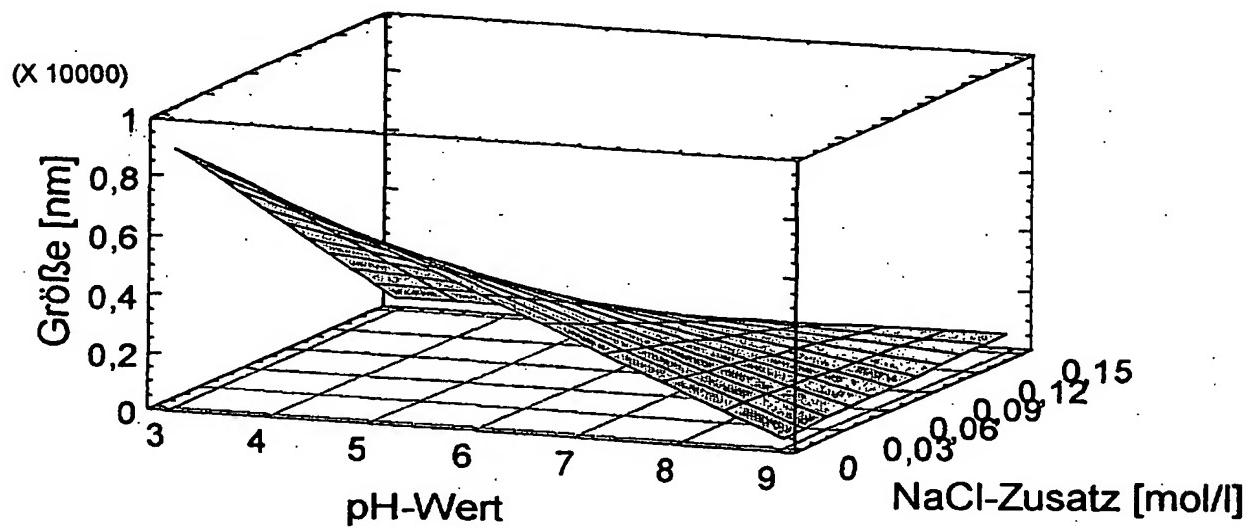


Abbildung 9: Einstellbarkeit der Polymer-Wirkstoff-Komplex-Eigenschaften

Einfluß von Ionenstärke und pH-Wert auf Partikelgröße



Einfluß von Ionenstärke und pH-Wert auf Oberflächenladung

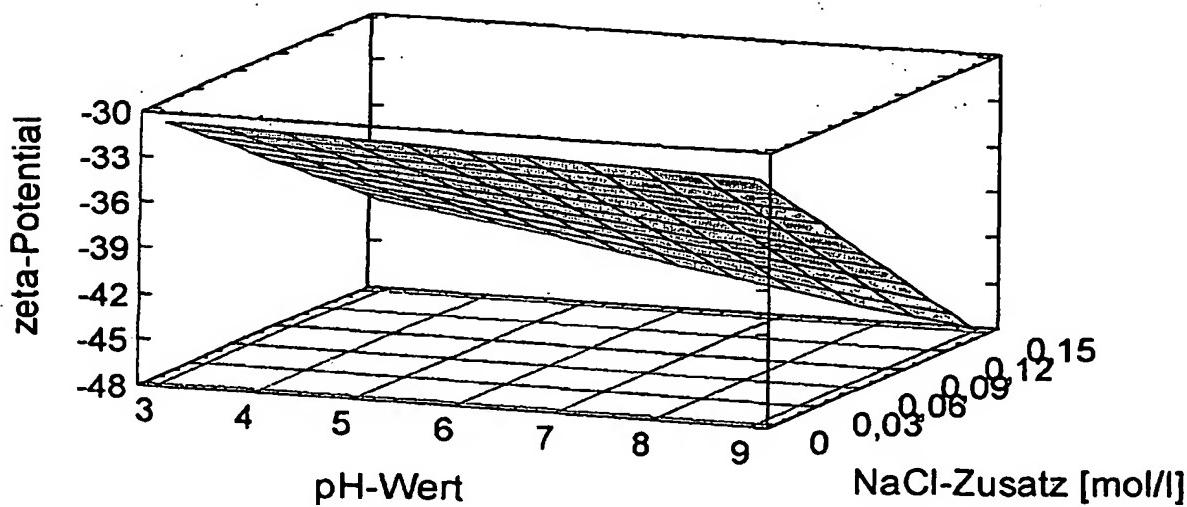


Abbildung 10: Polymer-Wirkstoff-Komplex Größensteuerung durch Emulgatorzusatz

PVAPL G57.1-Tetanus Toxoid-Komplex
mit 0,1 % Emulgator (PF68)

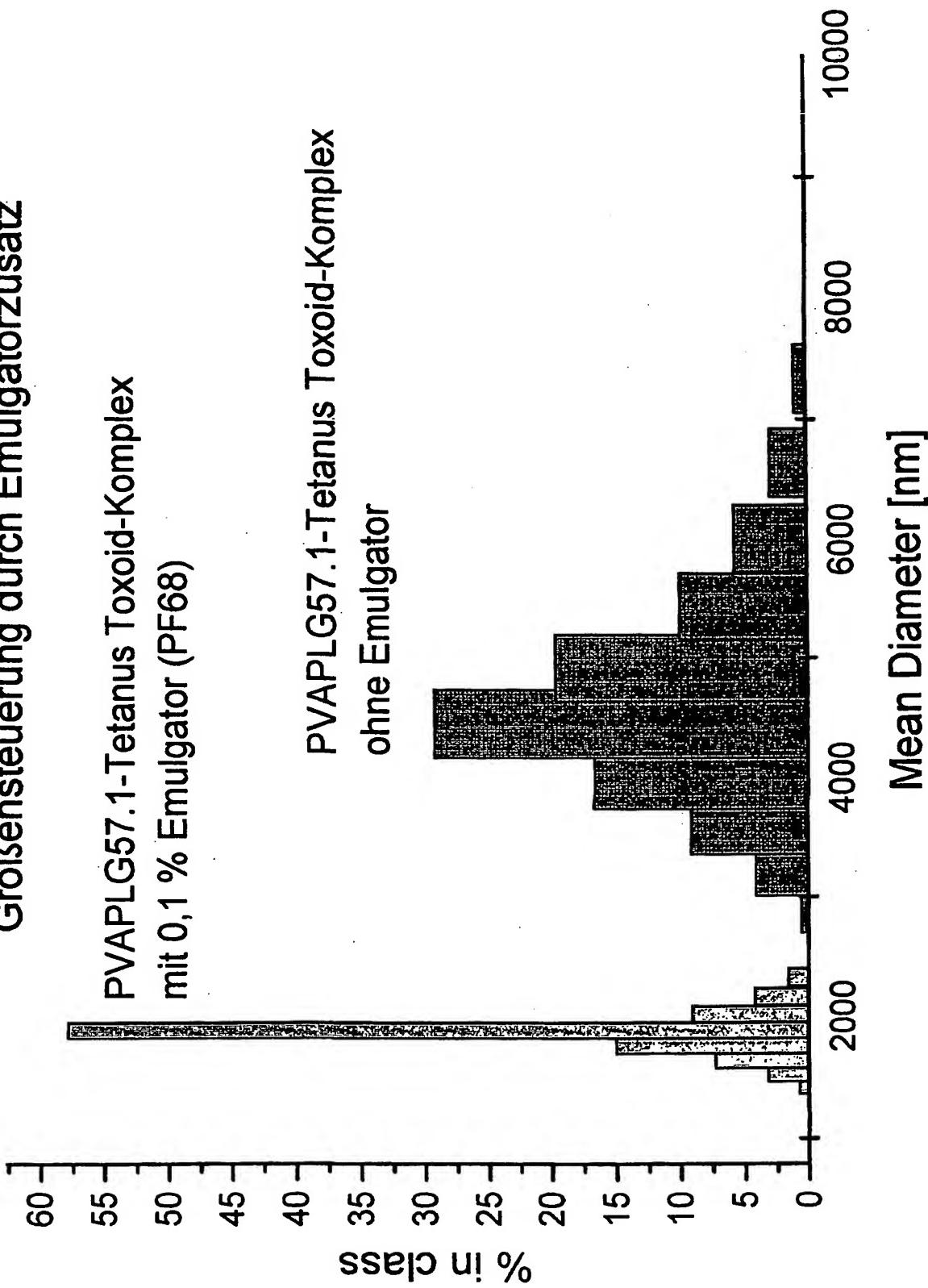


Abbildung 11: Polymer-Wirkstoff-Komplexe
Steuerung des Beladungsgrades

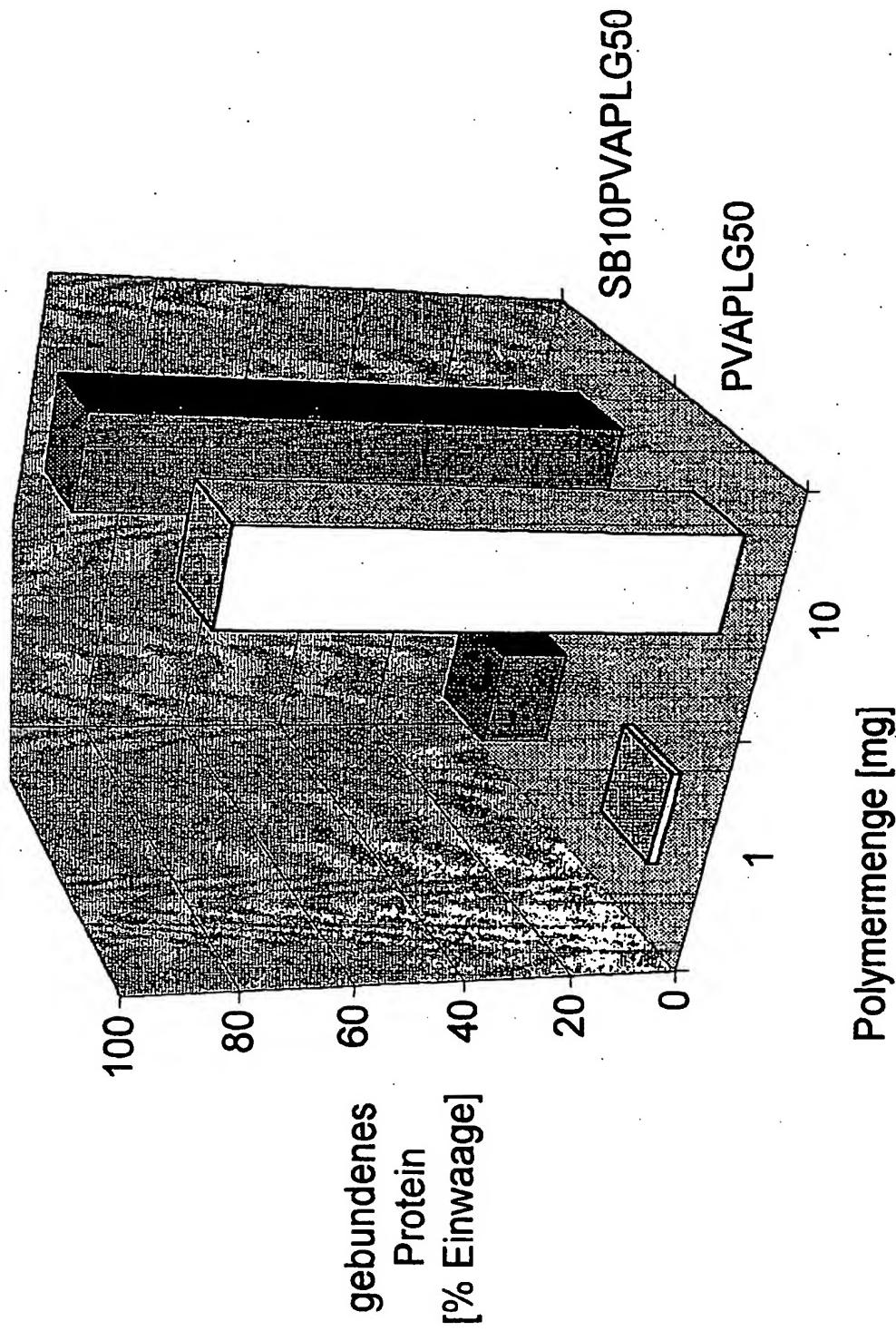


Abbildung 12: Polymer-Wirkstoff-Komplexe
Freisetzung von Tetanus Toxoid

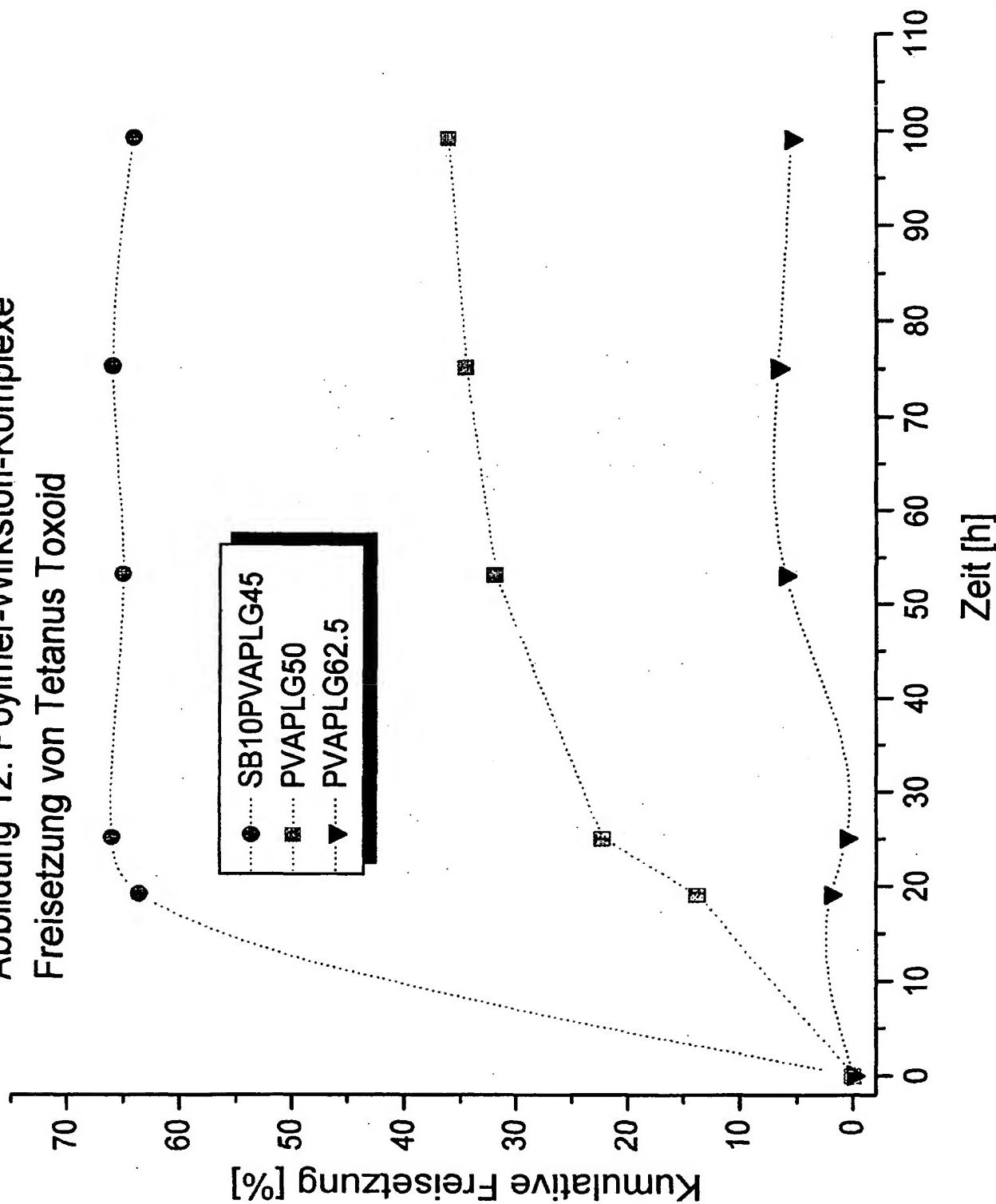
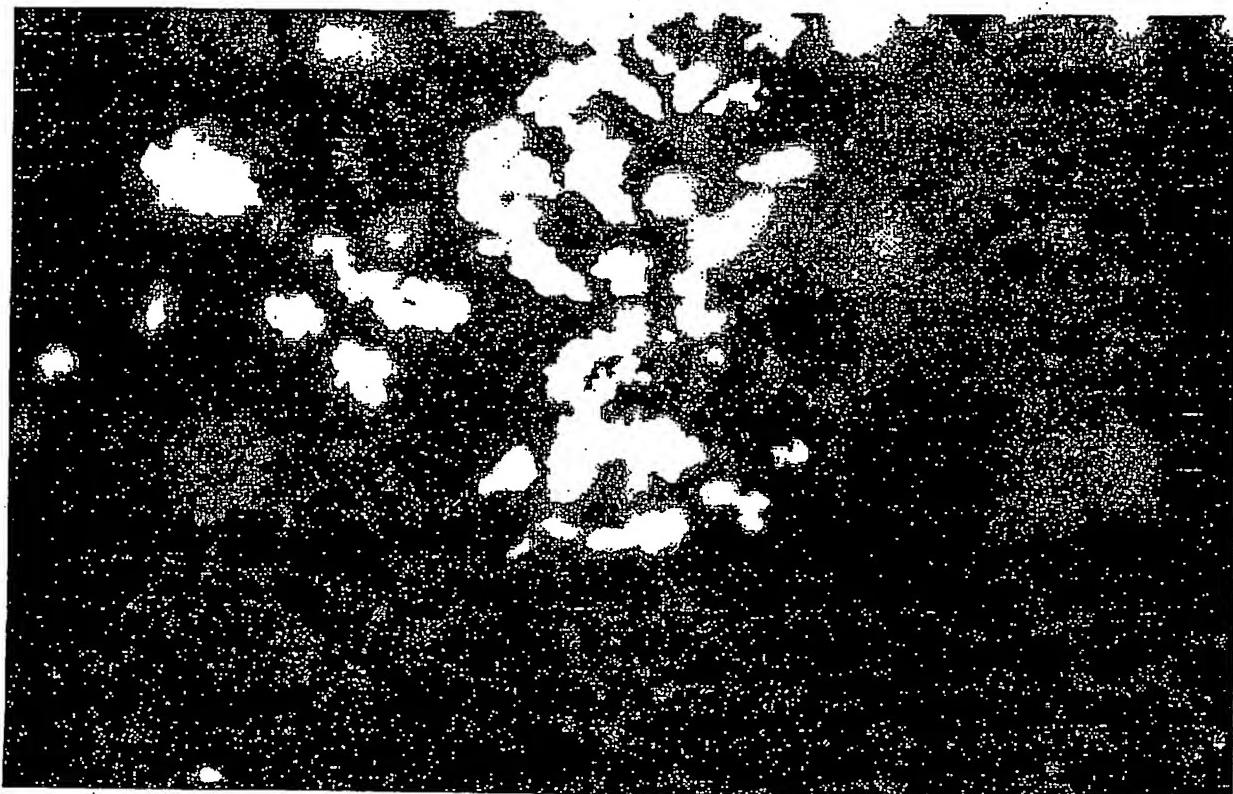
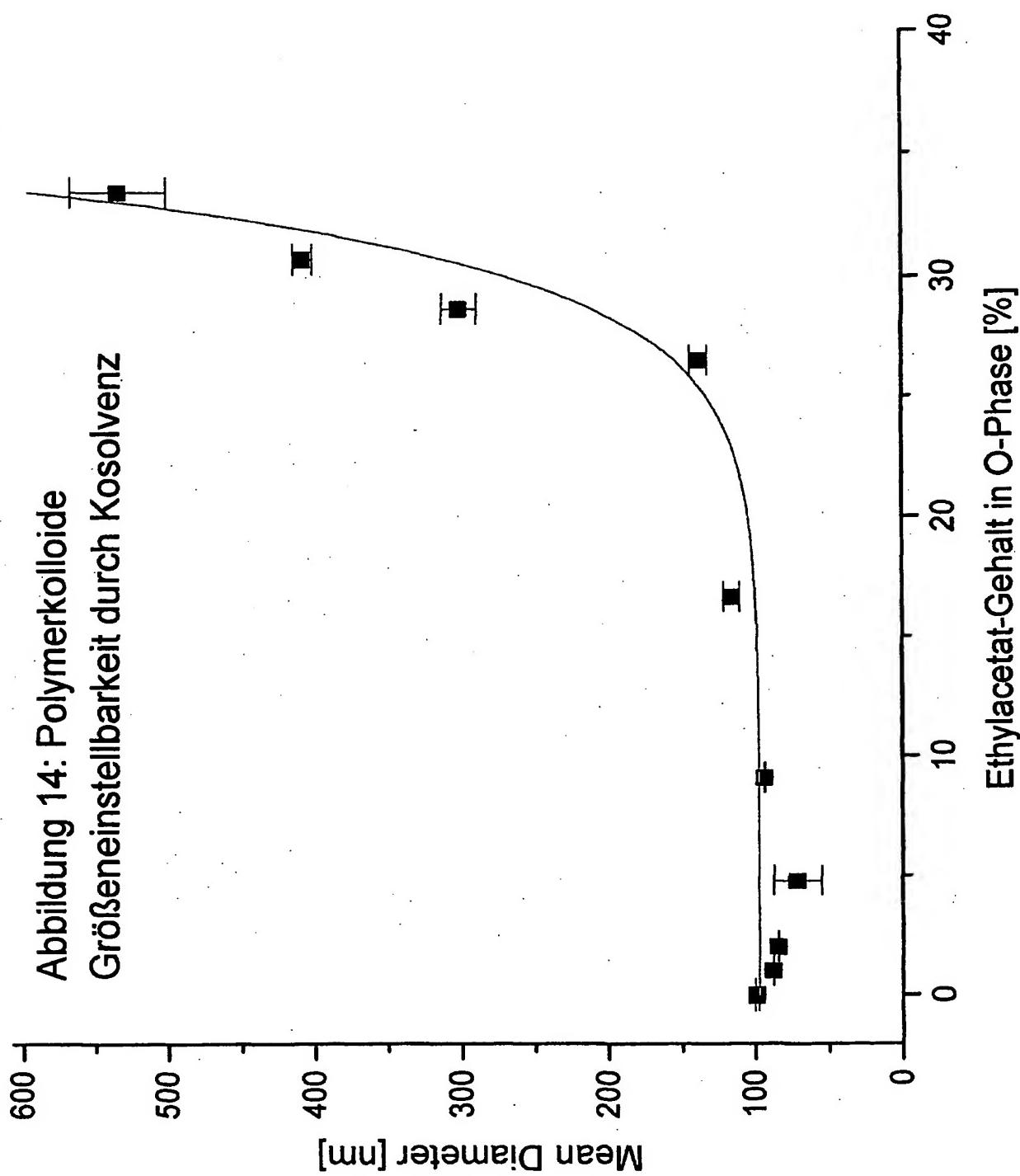


Abbildung 13: Polymer-Wirkstoff-Komplexe Bioadhäsion und Wirkstofftransport auf Zellen





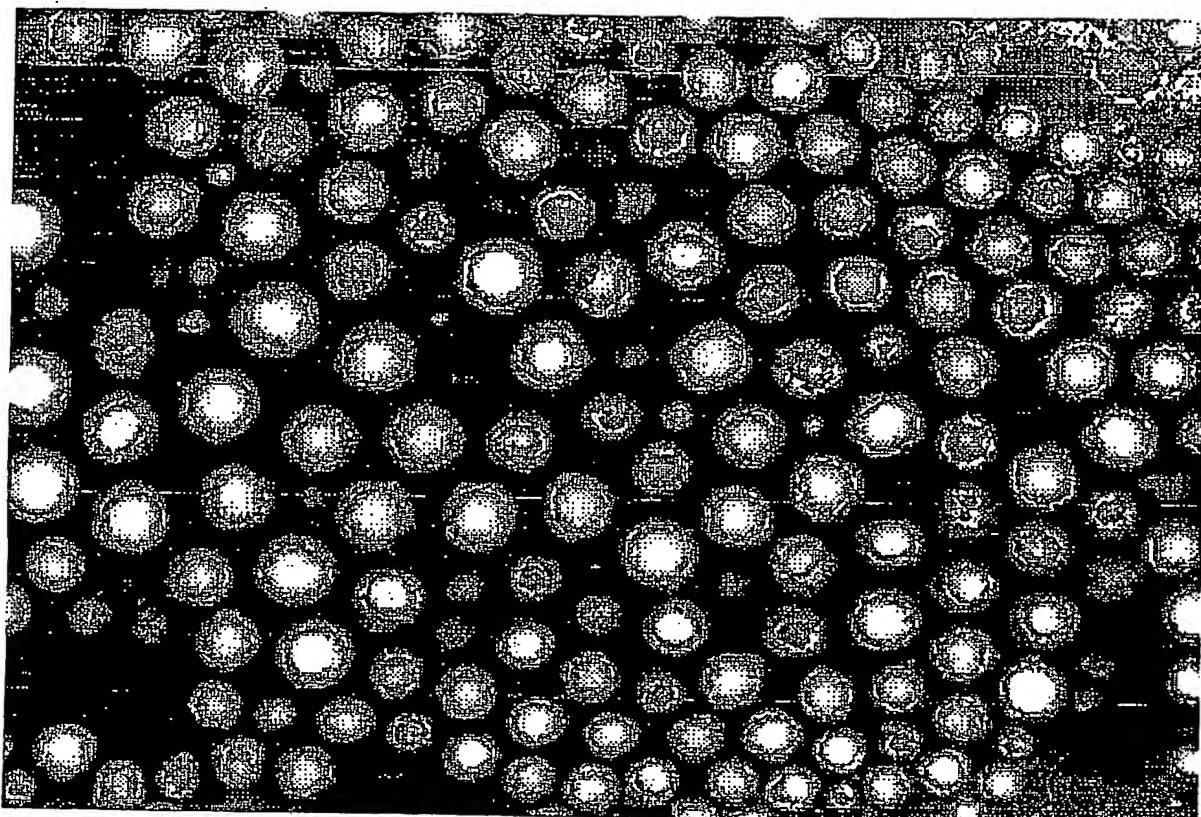


Abbildung 15: Polymer-Kolloide

100 nm

Abbildung 16: Polymerkolloide
Abhängigkeit der Partikeloberflächenladung
vom Emulgatorzusatz

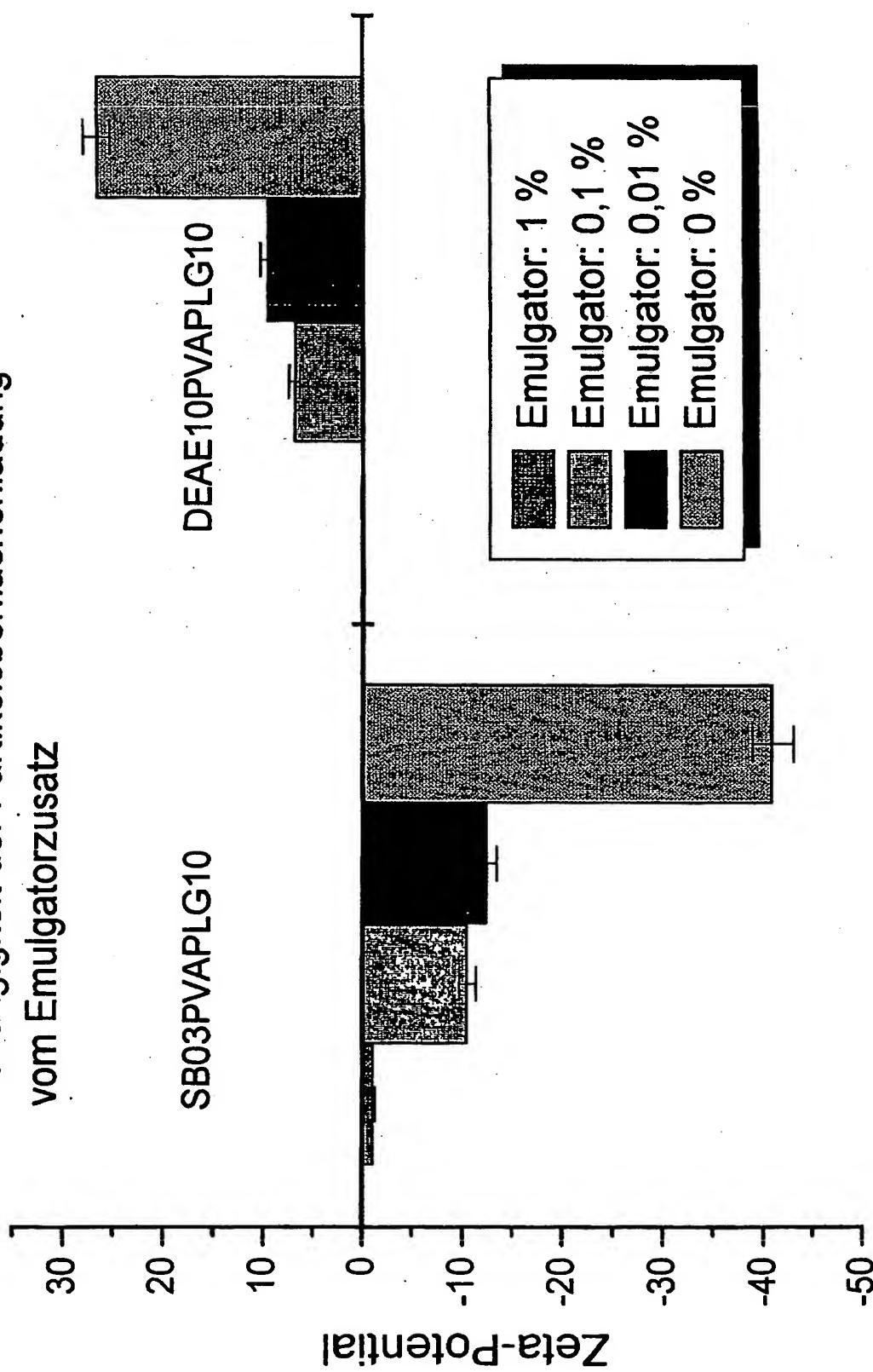


Abb. 17a: Partikel-Oberflächenladung als Funktion des zur Trägerpolymersynthese verwendeten Zentralpolyols (Zeta-Potential)

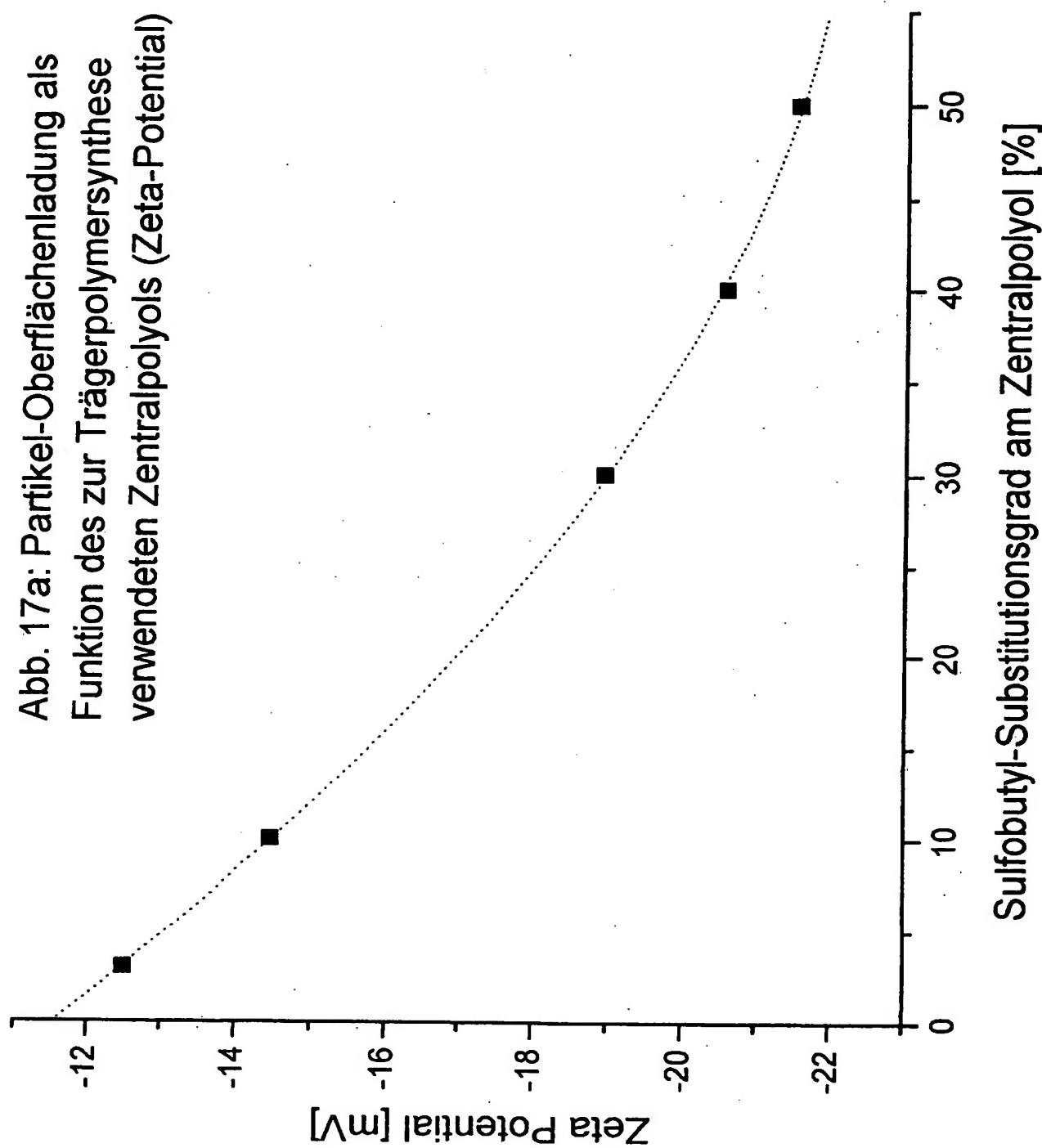
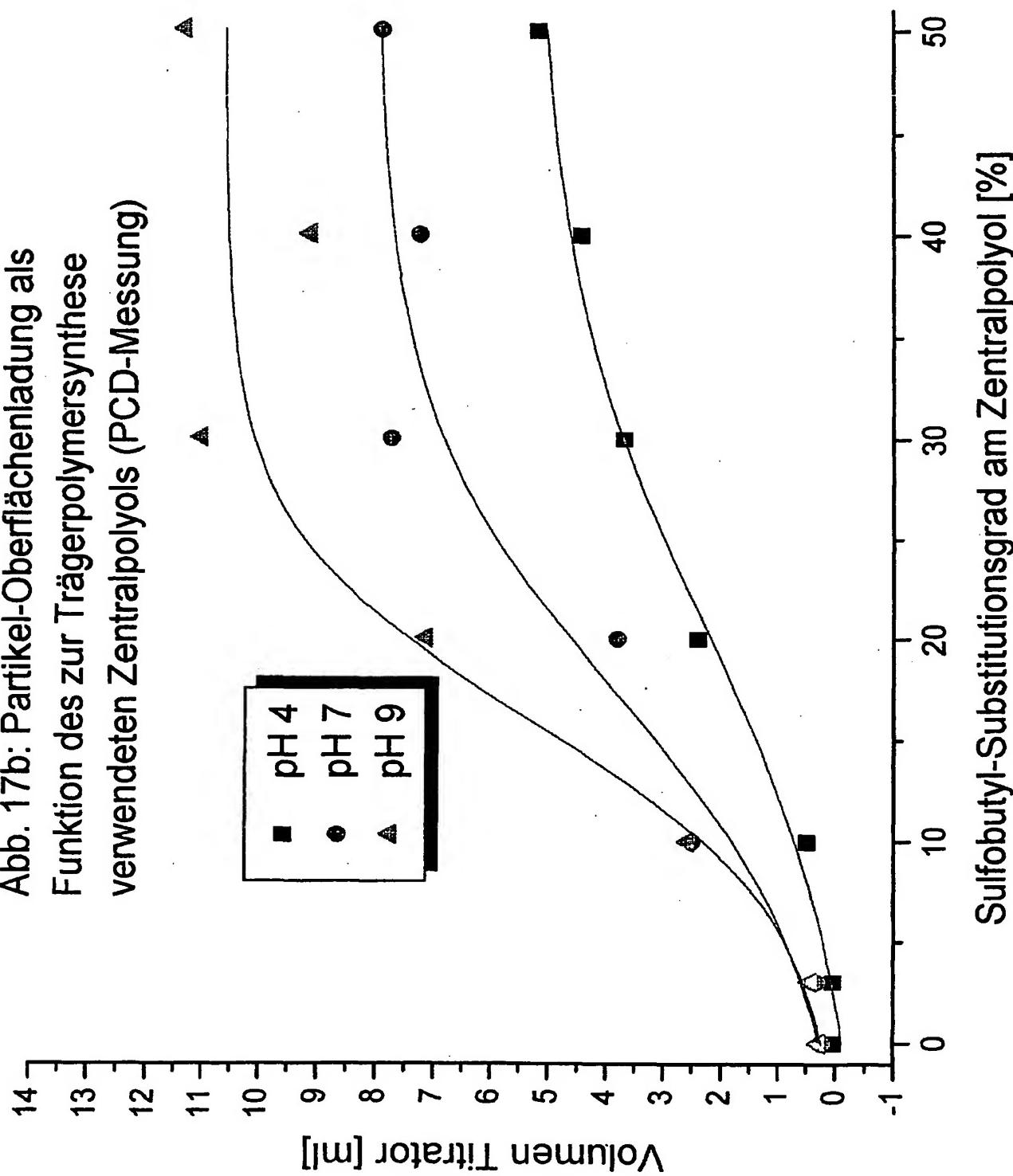
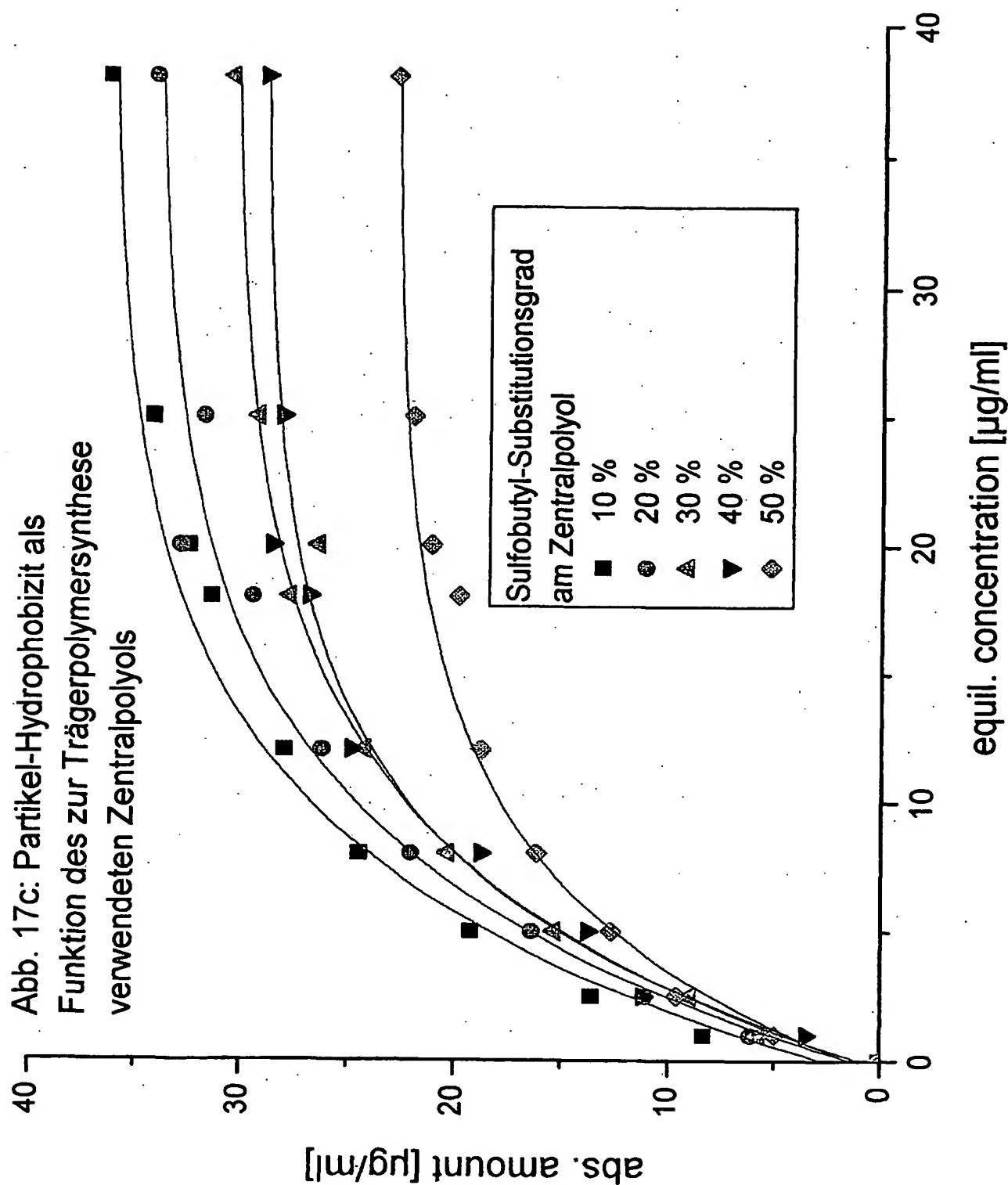


Abb. 17b: Partikel-Oberflächenladung als Funktion des zur Trägerpolymersynthese verwendeten Zentralpolyols (PCD-Messung)





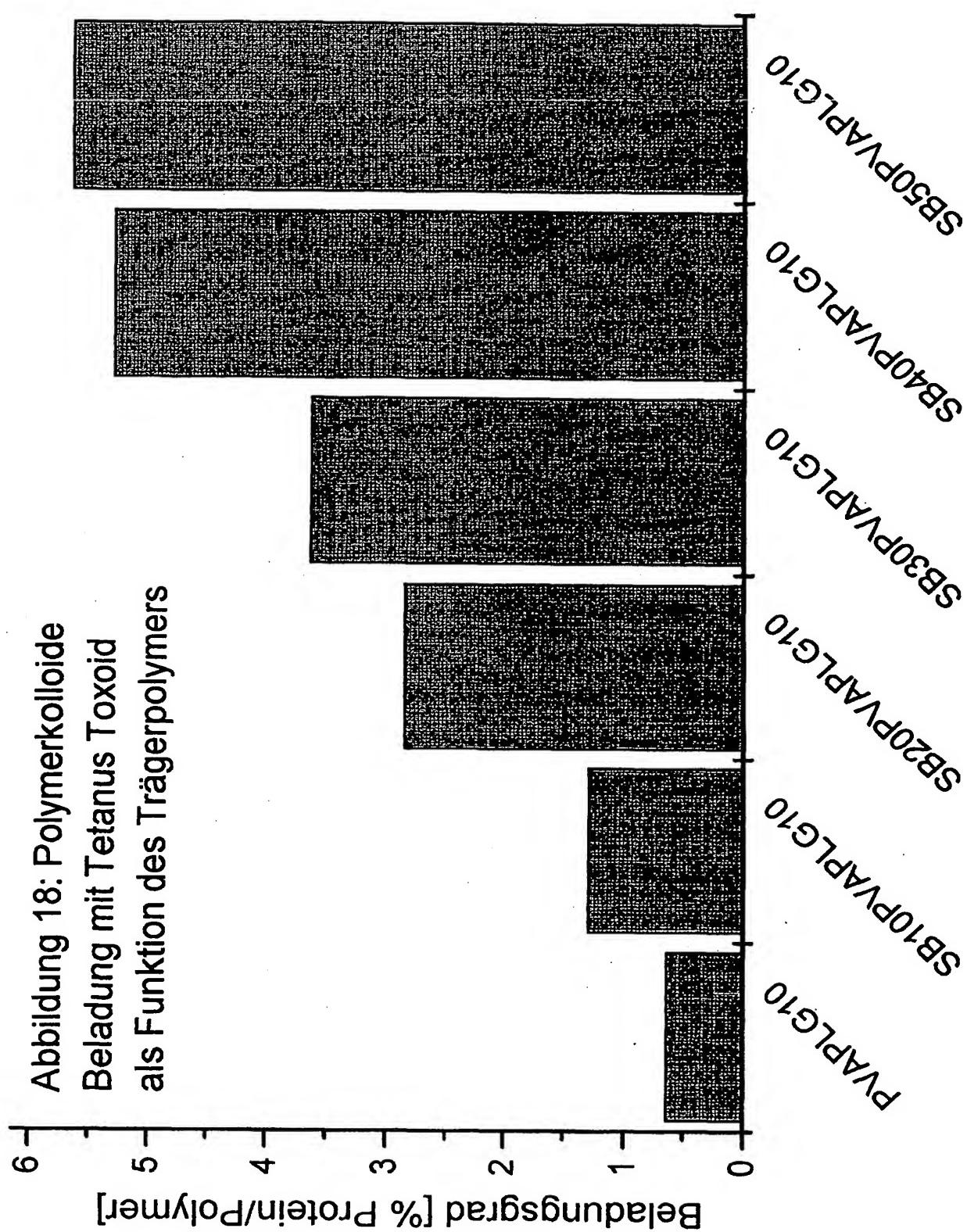


Abbildung 19: Kolloid-Ad- und Absorption
auf und in Zellen

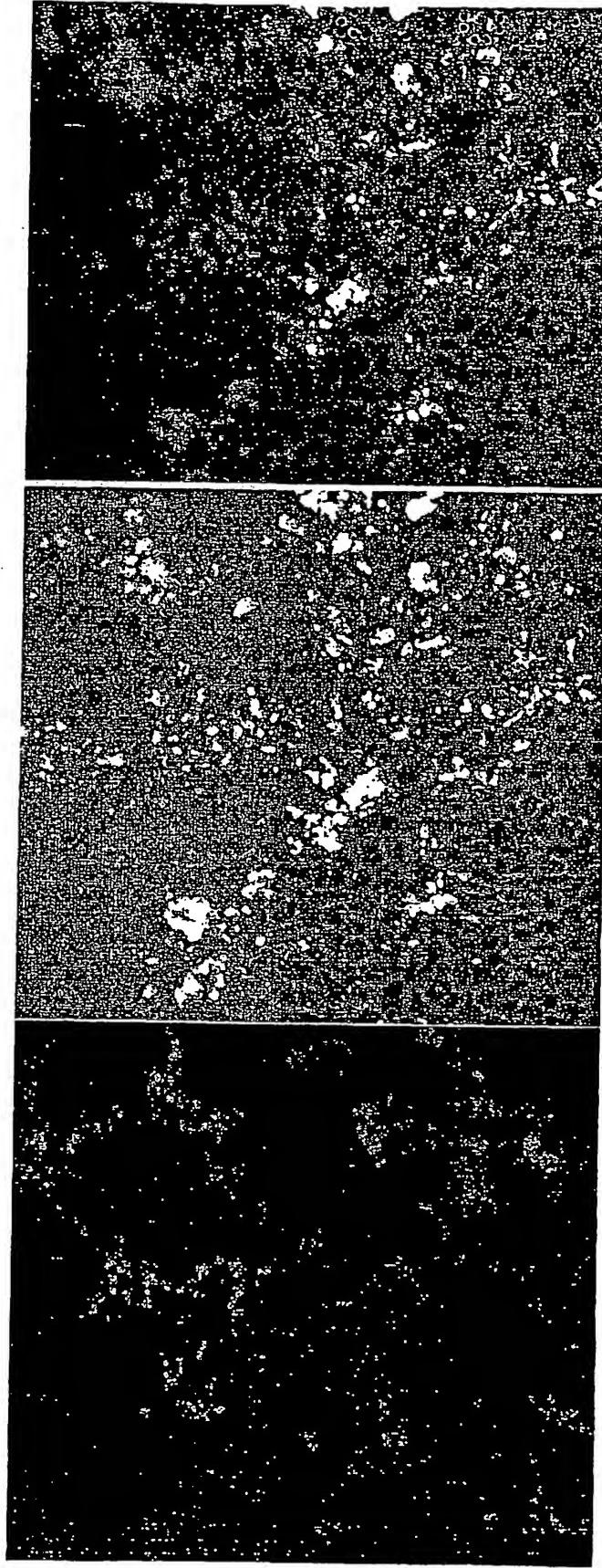


Abbildung 20: Polymerkolloide
Partikelad-/Absorption in Caco-2- Monolayern,
Nilrot-Label, Variation der Polymereigenschaften

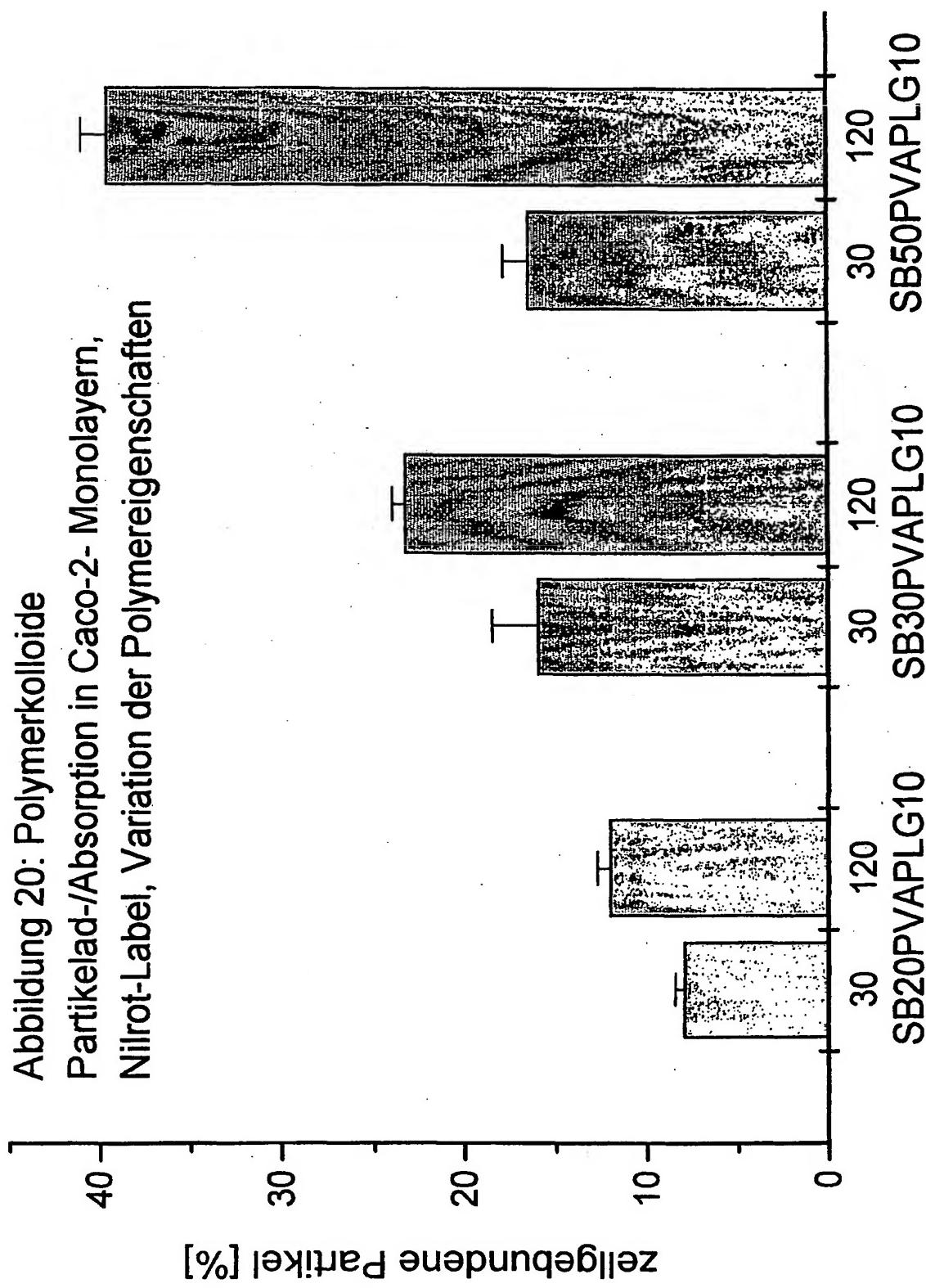


Abbildung 21a: Polymerkolloide: keine erkennbare Zytotoxizität: MTT Assay

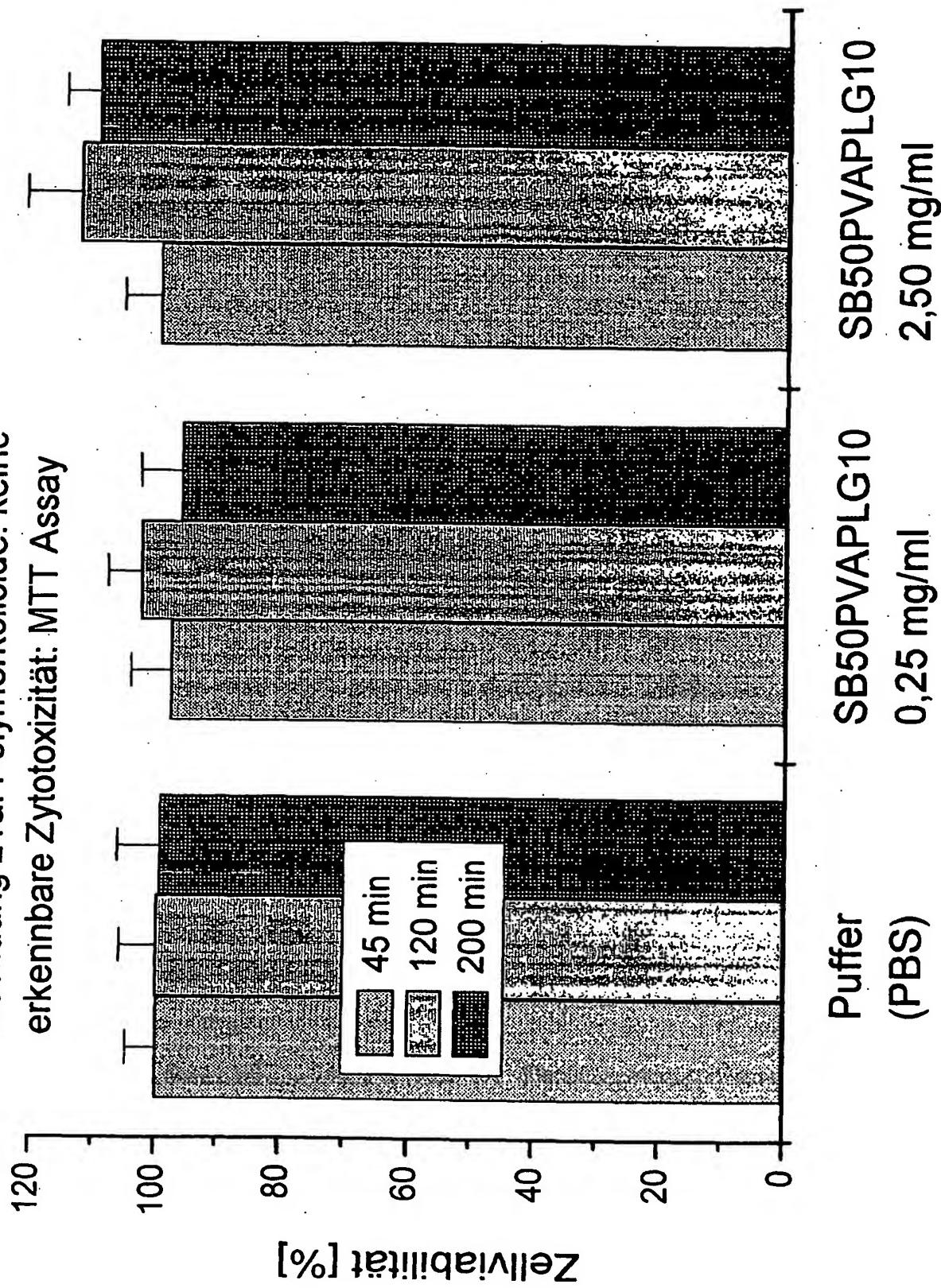
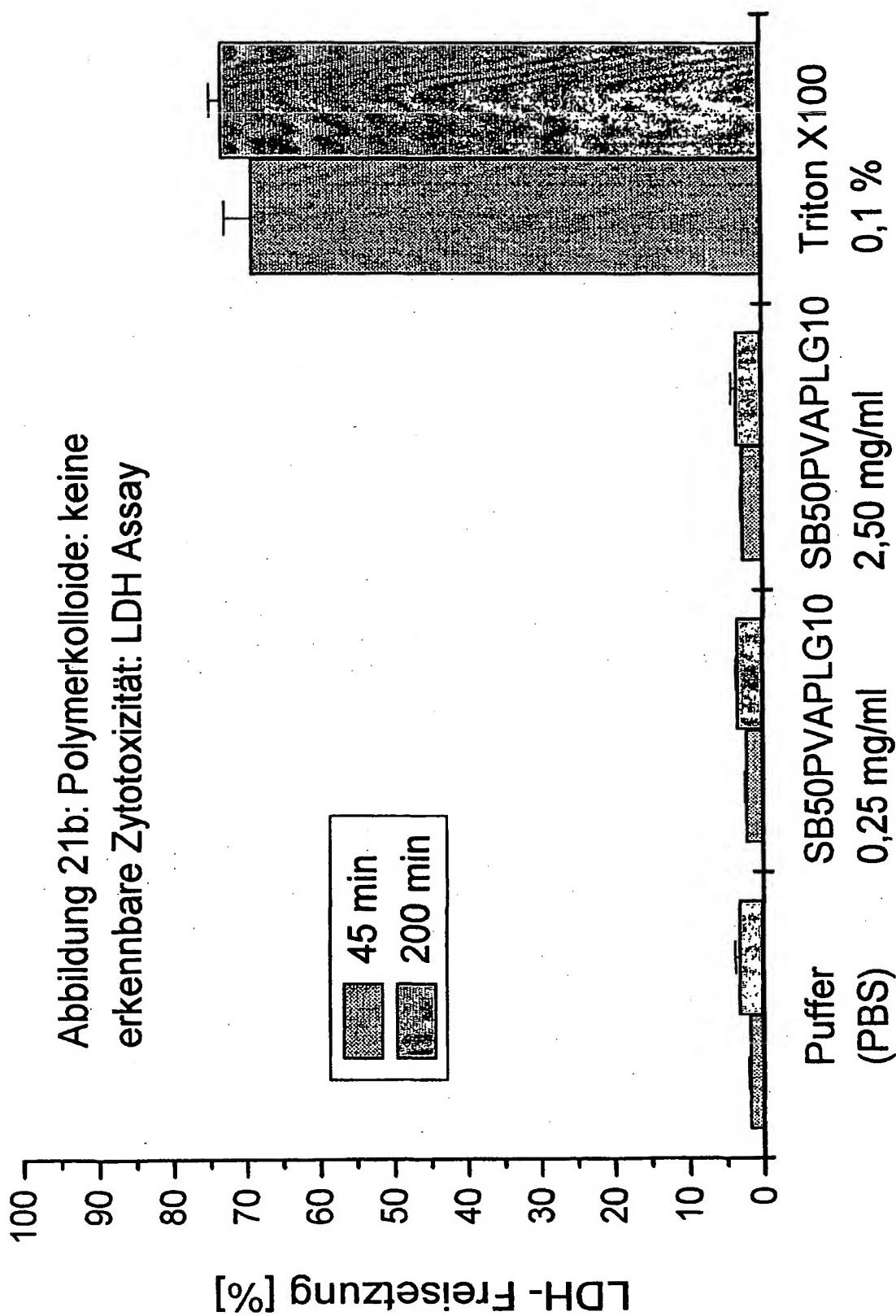


Abbildung 21b: Polymerkolloide: keine
erkennbare Zytotoxizität: LDH Assay



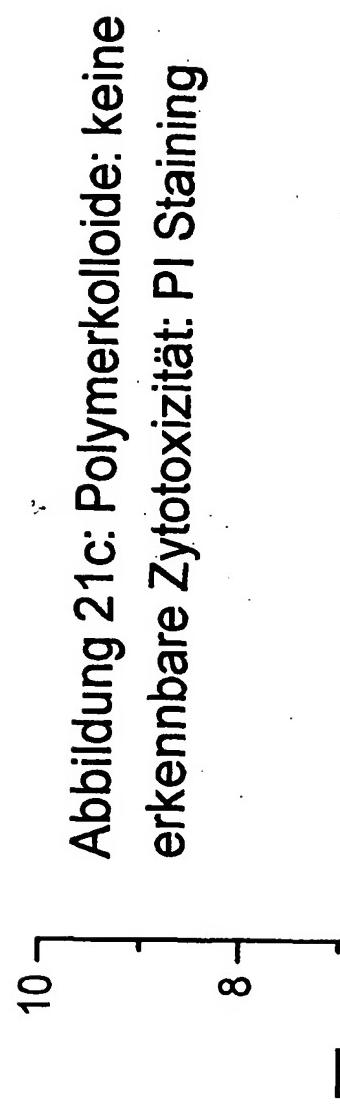
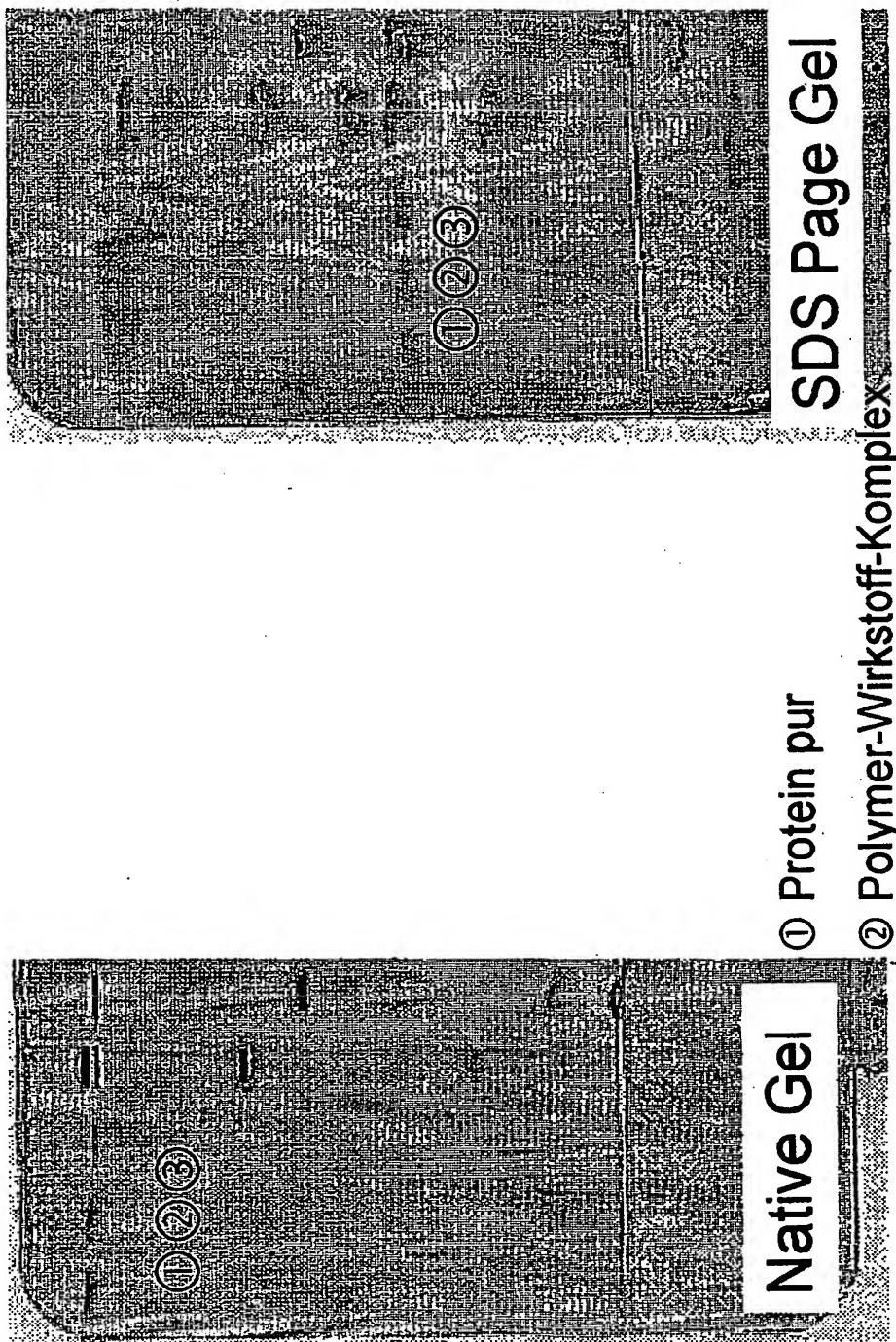


Abbildung 22: Polymer-Wirkstoff-Komplexe,
Stabilität des Wirkstoffs



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)